Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Robert Bauer

Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Co^{60}-Gammastrahlen und Trenimon (Triäthylen-iminobenzochinon) - einzeln und in Kombination - auf den Kern und den Nukleolus von Krebszellen (Stamm: HeLa) in der Interphase in vitro.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gertraude Stein
aus Weimar

8058

1964

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547602_0068

Aus dem Medizinischen Strahleninstitut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Robert Bauer

Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Co^{60}-Gammastrahlen und Trenimon (Triäthylen-iminobenzochinon) - einzeln und in Kombination - auf den Kern und den Nukleolus von Krebszellen (Stamm: HeLa) in der Interphase in vitro.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gertraude Stein
aus Weimar

1964

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dekan:	Prof. Dr. H. Harms
1. Berichterstatter:	Dozent Dr. K. Peters / Prof. Dr. R. Bauer
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H. J. Spechter

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung

1) Die Krebszelle ... 1

2) Bedeutung von Kern und Nukleolus ... 3

3) Bisherige Untersuchungen über die Wirkung von energiereichen Strahlen und Trenimon allgemein ... 5

4) Problemstellung ... 8

II. Material und Methode

1) Verwendeter Zellstamm ... 9

2) Gewebezüchtung ... 10

3) Bestrahlungstechnik ... 12

4) Trenimonapplikation ... 13

5) Zytologische Auswertung ... 15

a) Mikroskopische Aufnahmen ... 16

b) Planimetrie ... 16

c) Statistische Auswertung ... 18

III. Ergebnisse

A. Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen von HeLa-Zellen bei verschiedener Behandlung ... 21

B. Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen von HeLa-Zellen bei verschiedener Behandlung ... 26
C. Mittlere Kern- und Nukleolengrößen von HeLa-Zellen bei den verschiedenen Versuchsreihen ... 31
D. Mittlere Nukleolengrößen von HeLa-Zellen in Prozent der entsprechenden Korngrößen 38
E. Häufigkeitsverteilung der Kernflächen von HeLa-Zellen nach der Einwirkung verschiedener Strahlendosen ... 40
F. Dosiseffekte an HeLa-Zellen unter Verwendung der mittleren Kerngrößen bei verschiedener Behandlung ... 41
G. Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen von HeLa-Zellen nach der Einwirkung verschiedener Strahlendosen ... 44
H. Dosiseffekte an HeLa-Zellen unter Verwendung der mittleren Nukleolengrößen bei verschiedener Behandlung ... 45
I. Dosiseffekte an HeLa-Zellen unter Verwendung der mittleren Nukleolengrößen in Prozent der Kerngrößen bei verschiedener Behandlung ... 47

IV. Diskussion ... 50

V. Zusammenfassung ... 64

VI. Anhang:

Abbildungen und Tabellen ... 68

VII. Literaturverzeichnis ... 81

I. Einleitung:

Mit Sicherheit wird die Malignität des Geschwulstwachstums heute in die einzelne Krebszelle mit ihrer destruierenden Wirkung lokalisiert. Sie unterliegt einem dysregulierten, in verschiedenen Graden enthemmten Wachstum. Der Kern wird groß und hell, und seine Größe nimmt oft um das Doppelte zu; durch Amitose und andere pathologische Mitoseabläufe kann es zu mehrkernigen Zellen, zu Riesenzellen, kommen. Die übertriebene Leistungs- und Wachstumssteigerung führt häufig zum Kerntod durch Pyknose und Karyolyse. Das Chromatin vermehrt sich in hyperplastischen Kernen, und es entstehen mehrfache Chromosomensätze. Es zeigt sich eine Zunahme der Mitosen und der basophilen Substanz (L e t t e r e r, 1959).

H e i b e r g wies schon 1908 nach, daß die Zellen verschiedener Carcinome im Gegensatz zu ihren Mutter- und Geschwisterzellen häufig eine durchschnittliche Kernvergrößerung erkennen lassen. Seitdem beschäftigten sich viele Untersucher mit dieser Frage (H e i b e r g, 1938; J a c o b y, 1929; S c h a i r e r, 1935, 1937).

Auch der Nukleolus wird gegenüber gesunden Zellen schon häufig als auffällig vergrößert beschrie-

ben (Q u e n s e l, 1928). In ihm wird eine Vermehrung der basophilen Substanz und der mit fluoreszierenden Farbstoffen darstellbaren Ribosenukleotide gefunden. Diese Symptome deuten auf gesteigerten Zellstoffwechsel und somit gesteigertes Zellwachstum, vor allem des gesamten Eiweißumsatzes, was sich in einer Vermehrung von RNS in der Geschwulstzelle zeigt. Im Vergleich zur Norm weist jedoch der Stoffwechsel der Geschwulstzelle keine grundsätzlichen Verschiedenheiten auf; die anaerobe Glykolyse, die Tumorzellen zu Deckung ihres Energiebedarfes benutzen, wird auch bei verschiedenen Normalzellen gefunden (L e t t e r e r, 1959).

Somit haben Krebszellen mit ihren Mutter- und Geschwisterzellen das meiste gemeinsam, unterscheiden sich aber deutlich von diesen durch ihre niedrigere Stufe der Differenzierung, die sich u.a. in ihrer gleichzeitigen Wachstumsbeschleunigung bemerkbar macht. Beide Eigenschaften bedeuten für die Krebszelle eine größere Labilität gegenüber schädigenden Einflüssen wie chemischen Substanzen und energiereichen Strahlen. Bei der Anwendung von Krebsnoxen muß jedoch immer berücksichtigt werden, daß Versuche in vitro nie ganz den Verhältnissen in vi-

vo entsprechen. In der Gewebekultur handelt es sich um Zellen, die nicht unter dauernder Einwirkung des Gesamtorganismus stehen; außerdem erreichen die Substanzen die Krebszellen durch direkten Kontakt. (B a u e r, K.H.,1963).

Eine Zelle, gleichgültig welcher Herkunft, geht zugrunde, wenn ihr Kern geschädigt ist, denn der Kern ist das Stoffwechselzentrum der Zelle. "Kernbesitz ist also Ausdruck höherer Organisation durch stärkere Zusammenballung der Substrate für Stoffwechsel und Vermehrung der Zelle." (L e t t e r e r, 1959).

Morphologisch unterscheidet man außer der Kernmembran das Chromatin und das achromatische Kerngerüst, den Kernsaft und die Kernkörperchen. Die bedeutendste Funktion des Kernkörperchens ist die Teilnahme am Ribonukleinsäurestoffwechsel der Zelle. (P e t e r s,1963). Damit steht die Synthese der Zellproteine in Zusammenhang (C a s p e r s s o n,1950). Wie Versuche von P e r r y, H e l l a, E r r e r a (1961) ergaben, sind zwei Drittel der zytoplasmatischen RNS direkt von der Aktivität des Nukleolus abhängig.

Über die Bedeutung und Funktion des Nukleolus liegen zahlreiche Veröffentlichungen vor (S t i c h,

1956; B e e r m a n n,1960). Nach elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestehen alle tierischen Nukleolen aus fädigem Nukleonemata und der Pars amorpha. Eine Nukleolusmembran konnte nicht nachgewiesen werden (H o r s t m a n n,1958). Die Zahl der Nukleolen, die für jede Art konstant ist (H e i t z,1931), ist durch den Nukleolusorganisator bedingt, welcher aus DNS besteht (Mc C l i n t o c k,1934). Der Nukleolus selbst enthält Eiweißkörper vom Typ der Histone und Ribonukleinsäure. Die Histone sollen aus dem Heterochromatin der Chromosomen stammen. Von diesen ausgehend wird in der Telophase der Nukleolus wieder neu gebildet (L e t t e r e r,1959). Die Nukleolen unterliegen also einem ständigen Wechsel zwischen Aufbau und Abbau, je nach Funktions- und Generationswechsel der Zelle (P e t e r s,1963). Zum Beispiel zeigen sich Funktionsveränderungen nach Hunger oder Mangelernährung durch Größenzu- bzw. abnahmen (D a v i d, 1959). Damit kann der Nukleolus als Indikator des Zellstoffwechsels gelten, der bei anaboler Tätigkeit der Zelle größer und bei katabolischer kleiner wird (V i n c e n t,1955).

Wegen seiner zentralen Stellung im Zellstoffwechsel, was sich letztlich auch in seinem Enzym-

reichtum ausdrückt, wie vor allem der sauren Phosphatase (M u l n a r d,1955; V o r b r o d t,1958), ist der Nukleolus für radiobiologische Untersuchungen herangezogen worden.

Über die Strahlenwirkung an Zellen liegen Ergebnisse vor, die über die Strahlenempfindlichkeit von Zellteilen ganz allgemein aussagen, daß das Plasma relativ unempfindlich ist; die isolierte Bestrahlung von Zytoplasma bewirkt wesentlich geringere Veränderungen als eine Bestrahlung von Kernbestandteilen mit der gleichen Dosis (Z i r k l e, 1953). Am Zellkern werden bereits nach Bestrahlung mit einigen 100R Vakuolisierung und Pyknosen beobachtet. Das Anschwellen des Zellkernes jedoch wird als ein allgemeines und früh nachweisbares Kriterium nach einem Strahleninsult angesehen.

Eine relativ große Strahlensensibilität, die unter bestimmten Versuchsanordnungen noch diejenige der Zellkerne übertrifft (G a u l d e n und P e r r y,1958; S e e d,1960), zeigt auch der Nukleolarapparat. Strahlenbedingte Volumenzunahmen der Nukleolen sind relativ früh von C a t t l e y(1909) an Wurzelspitzenzellen festgestellt worden. Weitere Beobachtungen über die Größenzunahme der Nukleolen nach Bestrahlung von verschiedenen Zellarten lie-

gen von S c h e r e r, R i n g l e b und V e n t z-
k e (1953) vor. W e n d t (1953) konnte eine strah-
lenbedingte Nukleolenvergrößerung an Hühnerherzfi-
broblasten in vitro objektivieren. Ebenfalls an Hüh-
nerherzfibroblasten wird als weiteres Kriterium der
Strahlenwirkung das dosisabhängige Auftreten von nuk-
leolären Vakuolen beschrieben (P e t e r s,1955). Be-
züglich der HeLa-Zellen konnte bisher an strahlen-
induzierten Riesenzellen dieses Stammes eine Größen-
zunahme des Nukleolus elektronenmikroskopisch beob-
achtet werden (K o e h l e r,1962).

Im Gegensatz zur Strahlenwirkung auf Kern und Nukleolus hinsichtlich ihrer Größenänderung liegen über die Wirkung eines Zytostatikums wie des Trenimons in dieser Richtung keine Ergebnisse vor. G e r-
h a r t z und Mitarbeiter (1960) testeten Trenimon an Kulturen menschlichen Knochenmarks, wobei sie eine Senkung des Mitoseindex auf ein Viertel der Kontrollwerte feststellten. D o m a g k (1954) beobachtete an Ascitestumorzellen (E h r l i c h - Ascitestumor der Maus) nach Gabe von E_{39}, einer Vorstufe des Trenimons, Verklumpung der Mitosen, tropfige Entmischung der Chromosomen und amitotische Kernteilung (F i n k, 1954). Versuche an menschlichen Tumorzellen mit E_{39} weisen ebenfalls eine

Wirkung dieses Zytostatikums nach, erlauben aber keine Aussage über den direkten Angriffspunkt (G e r l i c h, 1956). Es ist zu beachten, daß alle Zytostatika verschiedene Angriffspunkte an der Zelle - am Plasma, am Ruhekern, an der Spindel - haben können (B a u e r, K.H., 1963); außerdem bestehen Unterschiede in der Empfindlichkeit der Tumoren gegenüber Zytostatika.

Hinsichtlich klinischer Erfahrungen mit Trenimon wird die beste therapeutische Wirksamkeit bei lokaler Applikation gesehen (L i n k e, 1960; G e r l i c h, 1960). S p i e s s l (1960) spricht von einem "Trenimonschutz" während einer Operation. Über weitere klinische Erfahrungen mit Trenimon berichten M e y t h a l e r und W e i l e r (1960).

Über Kombinationsbehandlungen von E_{39} mit massiver Röntgenbestrahlung liegen klinische Erfolge von B a u e r, E. (1957) vor; über kombinierte in vitro Versuche sind keine Ergebnisse bekannt. In diesem Zusammenhang sei auf das "Prinzip der Syncarcinokolyse" hingewiesen, welches besagt, daß bei der Syncarcinokolyse Mittel appliziert werden, die am gleichen Substrat, aber an verschiedenen Stellen desselben angreifen und dadurch ihre Wirkung kumu-

lieren oder potenzieren sollen (B a u e r, K.H., 1963).

Unter diesem Gesichtspunkt soll u.a. die Frage untersucht werden, ob in vitro Effekte einer Kombinationsbehandlung festzustellen sind. Dabei soll gleichzeitig eine eventuell unterschiedliche Auswirkung an Kern und Nukleolus in der Interphase Beachtung finden.

Die Methode der Gewebezüchtung bietet dafür günstige Voraussetzungen, da hiermit ein kontinuierliches und identisches Zellenmaterial zur Verfügung steht, sodaß fortlaufende und miteinander vergleichbare Versuche ausgeführt werden können.

II. Material und Methode:

Als Untersuchungsmaterial dienten menschliche Krebszellen vom Stamm: HeLa, der im Jahre 1952 von G e y und Mitarbeitern aus Probeexcisionsmaterial eines sehr unreifen, nicht verhornenden Plattenepithelcarcinoms der Portio uteri isoliert worden war. Seither züchtete man diesen Zellstamm, nach den Initialen der Patientin als Stamm: HeLa bezeichnet, fortlaufend in Rollertubes weiter. Trotz der nun schon mehrjährigen Weiterzüchtung blieben die wesentlichen Eigenschaften des malignen Ausgangstumors in vitro erhalten, wobei der relativ hohe Mitoseindex, das Auftreten von Riesenzellen mit einem bis zu vielen Zellkernen, zahlreiche Mitosestörungen und die relativ große Nekrobiosehäufigkeit als charakteristisch für den HeLa-Zellstamm anzusehen sind. Wenngleich es sich bei den Zellen in vitro um Zellen handelt, die der Gesamtorganisation des Organismus, wie hormonellen und nervösen Einflüssen, ständigem Eiweißumbau und Austausch entzogen sind, so ist - unter gewissen Einschränkungen - eine Übertragung auf die Verhältnisse in vivo möglich (P e t e r s,1960). Die HeLa-Zellen wachsen in vitro sehr gut und sind hinsichtlich ihres strahlenbiologischen Verhaltens gut bekannt (P e t e r s, 1958; G ä r t n e r,1958) .

Die Züchtung der HeLa-Zellen erfolgte in Vierkantflaschen in einem Nährmedium, das folgendermaßen zusammengesetzt war:

60% Hanksche Lösung

20% inaktives Humanserum

20% Embryonalextrakt

Das Humanserum war zur Sterilisierung durch einen Seitzfilter gezogen worden. Der Embryonalextrakt wurde von 9 Tage alten Hühnerembryonen gewonnen. Außerdem wurde dem Medium, da es für alle möglichen Keime ein optimales Wachstum ermöglicht, Penicillin (100 I.E pro ml) und Streptomycin (100 γ pro ml) zur Vermeidung von Infektionen zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,2 eingestellt; um ihn über längere Zeit zu erhalten, gibt man der Nährlösung Puffersubstanzen wie NaH_2PO_4 oder $NaHCO_3$ zu.

Die Züchtungstemperatur wurde auf 37°C eingestellt. Wie karyometrische Untersuchungen an Gewebekulturen zeigen, spielt die Züchtungstemperatur hinsichtlich der Kern- und Nukleolengrößen eine entscheidende Rolle, was bei den Versuchen berücksichtigt werden soll. Es wurde festgestellt, daß die bei Zimmertemperatur gehaltenen, langsamer wachsenden Kulturen kleinere Kerne und insbesondere kleinere Kernkörperchen haben, als die im Brutschrank gezüch-

teten Kulturen, und daß ihre Größen weniger streuen (B ü c h e r und G a t t i k e r, 1954).

In Intervallen von 3 bis 4 Tagen erhielten die Kulturen - je nach Stoffwechselaktivität - frisches Medium, und alle 12 bis 14 Tage wurden sie entsprechend ihrer Populationsdichte in neue Flaschen eingebracht. Dabei wurden die Zellen zunächst der Einwirkung einer Trypsinlösung (0,25%) ausgesetzt, um so die Interzellularbrücken zwischen den einzelnen Zellen zu lösen und sie von dem Glasboden zu entfernen. Nach einer Einwirkungszeit von etwa 10 min erhielt man so eine Zellsuspension; diese wurde bei 1000 U/min zentrifugiert und, um das restliche Trypsin zu entfernen, mit Hank'scher Lösung gewaschen. Anschließend wurden die nun so vorliegenden Zellen einer Vierkantflasche auf 2 bis 3 neue Flaschen verteilt, Nährlösung zugefügt und zur Weiterzüchtung und Bereithaltung eines ausreichenden Zellenmaterials bei 37°C im Brutschrank gehalten, da ein biologisches Untersuchungsmaterial nur dann geeignet ist, wenn es in genügender Menge und im gleichen physiologischen Zustand fortlaufend zur Verfügung steht.

Für die Auswertung der Kulturen war eine einschichtige Zellage Voraussetzung; deshalb wurden die für die geplanten Untersuchungen notwendigen Zellen

nach dem Trypsinisieren und Waschen in wenig Nährlösung aufgenommen und mit Pasteurpipetten auf Deckgläser, die in Reagenzgläsern horizontal liegen, aufgebracht. Nach erfolgtem Absetzen und Haften der Zellen an den Deckgläsern, d.h. nach etwa 6 Stunden, wurde das Medium in jedem Reagenzglas auf 2 ml ergänzt; die Gläser wurden in den Rollapparat gebracht (6 bis 8 Umdrehungen pro Stunde), wo sie im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C gehalten wurden. Im Laufe der Umdrehung des Rollers ist für die Zellkultur ein Wechsel von Luft und Nährlösung gewährleistet, da durch die Kohäsionskräfte des Mediums die Deckgläser im Reagenzglas fest haften.

24 Stunden nach oben beschriebener Explantation - bei optimalen Ernährungsbedingungen - erfolgte die Behandlung mit Trenimon (Triäthyleniminobenzochinon) bzw. Co^{60}. Für jede Versuchsreihe wurden möglichst Zellen aus einer Vierkantflasche entnommen.

Die Bestrahlung der Zellkulturen wurde mit einem Co^{60}-Bestrahlungsgerät durchgeführt, das ein radioaktives Isotop enthält, welches eine Kerngammastrahlung mit einer Energie von 1,17 und 1,33 MeV aufweist. Es wurden Einzeldosen von 250R, 500R, 1000R einer Isosisleistung von 40R/min mit Hilfe des "Gammatrons I" der Siemens-Reiniger-Werke (Nennaktivität: 2000Curie)

verabreicht. Der Fokusabstand betrug 80,5 cm. ~~Die angewandten Strahlendosen liegen im therapeutisch gebräuchlichen Bereich.~~ Die jeweilige Dosis wurde vor Versuchsbeginn am Ort der späteren Präparatelage im Reagenzglas ausgemessen, indem die Standard-schlauchkammer im Vorversuch in ein entsprechendes Reagenzglas eingebracht wurde. Die Bestrahlung der Kulturen erfolgte nun so, daß je Einzeldosis 8 Reagenzgläser mit den auf Deckgläsern gezüchteten Zellen nebeneinander lagen. Das Bestrahlungsfeld war dabei so ausgeblendet, daß sich alle Kulturen im 100%-Dosisbereich befanden.

Als Zytostatikum fand Trenimon Anwendung. Seiner chemischen Struktur nach ist es 2,3,5-Triäthylenimi-nobenzochinon und gehört in die Reihe der Äthylen-iminobenzochinone. Mit ihnen wurde 1954 von D o m a g k und den Chemikern P e t e r s e n und G a u s s eine neue Wirkstoffgruppe carcinokolytisch wirkender Substanzen in die Therapie eingeführt. Die ersten Substanzen waren das "E_{39}" (D o m a g k, 1957). Später folgte das "E_{39} solubile". Als wichtigstes Produkt dieser Reihe hat sich inzwischen das in der Klinik gebrauchte Trenimon erwiesen (Lit. bei L i n k e und F r e u d e n b e r g e r,1960), das als "Bayer 3231"

eine Fortentwicklung der Präparatereihe "Bayer E_{39}" darstellt (B a u e r, K.H., 1963).

Für die hier durchzuführenden Untersuchungen wurde Trenimon im Medium in einer Verdünnung von 1:20 Millionen (g/ml) als günstigste Verdünnung ermittelt. Bei diesen orientierenden Vorversuchen waren zytostatische Effekte gut nachweisbar, und die Toxizität war nicht zu groß. Die Herstellung der Lösungen erfolgte unter Verwendung der auch in der Klinik benützten Trockenampullen der Firma B a y e r. Sie enthalten 0,2 mg Trenimon in Pulverform. Diese 0,2 mg Substanz wurden in 20 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung, die mitgeliefert wurde, in Lösung gebracht. 0,2 ml der so erhaltenen Lösung wurde mit Hankscher Lösung auf 10 ml ergänzt ; und damit erhielt man eine Konzentration von 1:5 Millionen. Darauf wurden 0,5 ml dieser Lösung mit 1,5 ml Nährmedium auf 2 ml aufgefüllt und in die Reagenzgläser mit den auf den Deckgläsern wachsenden Zellkulturen gegeben. In dem Medium lag nun eine Trenimonkonzentration von 1:20 Millionen (g/ml) vor.

Bei Kombinationsversuchen wurde Trenimon unmittelbar nach der Bestrahlung hinzugegeben, um eine Veränderung des Trenimons durch die Bestrahlung auszuschließen.

Es wurden, gemäß oben beschriebener Bedingungen, folgende Versuchsreihen durchgeführt:

1. Versuchsreihe:
Bestrahlung der Kulturen mit Co^{60} in Einzeldosen von a) 250R; b) 500R; c) 1000R.

2. Versuchsreihe:
Zugabe von Trenimon zu den Kulturen (1:20 Millionen).

3. Versuchsreihe:
Kombinierte Behandlung der Kulturen mit:
a) 250R plus Trenimon (1:20 Millionen)
b) 500R plus Trenimon (1:20 Millionen)
c) 1000R plus Trenimon (1:20 Millionen).

Außerdem wurden zu allen Versuchspräparaten entsprechende Kontrollpräparate hergestellt. Bis auf die Behandlung mit Trenimon bzw. Co^{60} unterlagen sie genau denselben Bedingungen wie die Versuchspräparate. Z.B. wurden die Kontrollpräparate während der Bestrahlung der entsprechenden Versuchspräparate ebenfalls der Zimmertemperatur ausgesetzt.

Die Präparate wurden für die cytologisch-statistische Auswertung nach B o u i n 15 min fixiert und mit Eisen-Hämatoxylin nach W e i g e r t gefärbt. Es wurden Fixierungszeiten von 3, 9, 12, 24 Stunden und 5 Tagen nach der Einwirkung von Trenimon bzw. Co^{60}

gewählt, um den zeitlichen Ablauf der durch diese Noxen hervorgerufenen Veränderungen erfassen zu können.

Die Auswertung der angefertigten Präparate erfolgte in der Weise, daß zunächst mit Hilfe eines Zeissmikroskopes (Okular 10x, Ölimmersion A 1,30) Mikroaufnahmen auf Kleinbildfilme angefertigt wurden, und zwar mit einer mikroskopischen Vergrößerung von 400:1. Dabei kamen in jedes Blickfeld durchschnittlich 10 bis 15 Zellen zu liegen. Anschließend wurde eine Nachvergrößerung dieser Aufnahmen auf 3215:1 durchgeführt. Es wurde L a b a p h o t - Papier verwendet (DinA $_4$). Im Ganzen wurden auf diese Weise etwa 360 Vergrößerungen mit durchschnittlich 10 bis 15 Zellen pro Aufnahme erhalten. Es stand damit ein Material von circa 3600 HeLa-Zellen zur Verfügung. Pro Versuchsreihe wurden je Fixierungszeitpunkt 100 Zellen verwendet, deren Kern- und zugehörige Nukleolenflächen mit Hilfe eines P lan i m e t e r s erfaßt wurden. Es wurde diese Art der Auswertung gewählt, da damit gewährleistet war, daß die vorwiegend irregulär geformten Nukleolen flächenmäßig exakt erfaßt werden können, was bei Ausmessungen mit dem Okularmikrometer, mit dem Kernflächen bzw. -volumina relativ gut ermittelt werden können, nicht möglich gewesen wäre.

Um eine möglichst große Genauigkeit der Meßresultate zu erzielen, wurde 1. als Planimetrierunterlage ein gut haftendes, nicht glattes Spezialpapier (A s t r a l o g) verwendet; 2. wurde jeder Kern und Nukleolus je 10 mal umfahren und der Mittelwert bestimmt. Enthielt ein Kern mehrere Nukleolen, so wurde jeder Nukleolus einzeln ausgemessen, und dann wurden die Meßresultate der verschiedenen Nukleolen addiert.

Die Ermittlung von Mittelwert und Streuung der Kern- und Nukleolengröße geschah für jede Versuchsreihe, ebenso für die entsprechenden Kontrollkulturen. Die Registrierung der bei den verschiedenen Strahlendosen bzw. bei Trenimonbehandlung und den einzelnen Fixierungszeiten erhaltenen Häufigkeitsverteilungen erfolgte in graphischen Darstellungen, für jede Fixierungszeit getrennt (z.B. bei 3 Stunden: Kontrolle, 500R, Trenimon, 500R plus Trenimon). Dabei wurde auf der Ordinate in Prozent die in einem bestimmten Größenbereich erhaltene Anzahl der Kerne bzw. der Nukleolen in metrischem Maßstab aufgetragen und auf der Abszisse die Flächen der Kerne bzw. der Nukleolen in μ^2 in logarithmischem Maßstab. Für die Umrechnung der in mm^2 erhaltenen Planimetrierungsflächen in μ^2 war vorher ein Faktor von 0,1023 er-

mittelt worden, d.h. 1 $mm^2 \triangleq 0{,}1023\ \mu^2$.

Zur statistischen Beurteilung der Unterschiede zwischen den einzelnen zu vergleichenden Mittelwerten bei verschiedener Behandlung der Kulturen diente das t - Verfahren von F i s h e r (1938). Dabei wurden Sicherungsgrenzen P von 2%, 1% und die von K o l l e r (1953) berechnete Grenze für eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0,27% berücksichtigt. Die Differenz von zwei zu vergleichenden Mittelwerten M_D wird dabei mit dem Vielfachen der Differenz der Streuung σ_D ins Verhältnis gesetzt. Der Fehler der Mittelwertsdifferenz wird nach folgender Formel berechnet:

$$\sigma_D = \sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}$$

Das Vielfache von σ_D stellt sich dar als:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sigma_D}$$

Ein Unterschied zwischen zwei Mittelwerten gilt danach als signifikant, wenn die Differenz der Mittel-

tipliziert mit dem t - Wert:

$$M_D > \sigma_D \times t$$

Die hier verwendeten t - Werte beim Vergleich von zwei Mittelwerten aus je 100 Messungen sind für die Sicherungsgrenzen von P nach den statistischen Tafeln von F i s h e r (1938) folgende:

P	2%	1%	0,27%
t	2,33	2,58	3,00

Weiterhin wurden bestimmt:

1. Die Nukleolengrößen in Prozent der zugehörigen Kerngrößen nach $\frac{N \times 100}{K}$ aus den Mittelwerten für jede Versuchsreihe.
2. Die Mittelwerte der Kerngrößen und der Nukleolengrößen einer Versuchsreihe, bezogen auf den 3 - Stundenwert der Kontrollen (= 100%).

Für 1. und 2. erfolgten graphische Darstellungen, wobei auf der Ordinate die Prozentzahlen, auf der Abszisse die verschiedenen Fixierungszeiten von 3, 9, 24, 48 Stunden und 5 Tagen aufgetragen wurden. Diese Art der graphischen Darstellung wurde auch zur Sichtbar-

Wachstum von Dosiseffekten zwischen einer Einwirkungszeit von 9 und 24 Stunden bei Einzeldosen von 250R, 500r und 1000R und derselben Behandlung in Kombination mit Trenimon verwendet.

III. Ergebnisse:

A. Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen von Hela-Zellen der Kontrollkultur, bei Behandlung mit 500R, Trenimonbehandlung (1:20 Kulturvol.) und kombinierter Behandlung bei Fixierungszeiten von 2, 9, 24, 48 Stunden bei 3 Tagen.

1) Fixierungszeit: 2 Stunden nach Behandlung (Abb. 1).

In der kalibrierten Darstellung von Abb. 1 ergibt die Kerngrößen-Häufigkeit beim Vergleich der Kontrollwerte mit den Werten bei Trenimon- und 500R - Trenimonbehandlung einen nahezu kongruenten Kurvenverlauf mit einem Maximum von 43% der Messungen bei der Kernfläche von 126 μ^2. Im Gegensatz dazu sind die Kerngrößen bei Kombinationsbehandlung mit 500R deutlich nach rechts verschoben und zeigen eine Gruppe von 15% bei 251 μ^2 und 19% der Messungen, also eine deutliche strahlenabhängige Kernvergrößerung, wobei mit 251 μ^2 ein Verdoppelungsschritt erreicht wird.

2) Fixierungszeit: 9 Stunden nach Behandlung (Abb. 2).

Bei einer Fixierungszeit von 9 Stunden nach Behandlung ergeben sich keine wesentlichen Unterschiede gegenüber den Ergebnissen bei einer Einwirkungszeit von 3 Stunden nach Behandlung

festzustellen. Bei Kontrolle, Trenimon-, 500R + Trenimonbehandlung und jetzt auch bei Bestrahlung mit 500R liegt (bei 30% bis 34% der Messungen) das Maximum der Kerngrößen eindeutig bei 126 μ^2. Deutlich tritt wieder der zweigipfelige Kurvenverlauf der Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen bei Bestrahlung mit 500R hervor: 19% der gemessenen Kerne haben eine Größe von 126 μ^2, 13% eine Größe von 251 μ^2. Daraus ist ersichtlich, daß der beim 3 - Stundenwert aufgetretene Kernflächen-Verdoppelungsschritt nach 9 Stunden noch vorhanden ist.

[illegible] Fixierungszeit: 24 Stunden nach Behandlung (Abb.1).

Während sich bei den Fixierungszeiten von 3 und 9 Stunden noch keine Abhängigkeit der Kerngrößenverteilung von der Einwirkungszeit nach Behandlung der Kulturen mit Trenimon und 500R + Trenimon erkennen läßt, ist bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden ein von ihr abhängiger Effekt festzustellen: Gegenüber den Kerngrößen der Kontrollkultur zeigen diese jetzt bei Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung eine deutliche Verschiebung nach rechts, und zwar bei beiden Behandlungsarten nahezu [illegible] mit einem Maximum von 159 μ^2 bei [illegible] der Messungen. Der Effekt [illegible] der Kerngrößen-

verteilung bei Bestrahlung mit 500R allein hat sich gegenüber der Fixierung nach 9 Stunden Einwirkung außer einer geringen Streuungszunahme und einer damit verbundenen Abnahme des deutlichen Kernflächenverdoppelungsschrittes kaum geändert.

4) Fixierungszeit:48 Stunden nach Behandlung (Abb.1).

Bei einer Fixierungszeit von 48 Stunden zeigt sich eine Streuungszunahme der Kernflächen der Kontrollkultur, bei Bestrahlung mit 500R und Trenimonbehandlung nach einer Einwirkungszeit von 48 Stunden gegenüber den Werten bei Fixierungszeiten von 3, 9, 24 Stunden. Auffallend ist außerdem, daß sich die Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen bei der kombinierten Behandlung (500R + Trenimon) nach einer Einwirkung von 48 Stunden genauso verhält wie bei einer Fixierungszeit von 9 Stunden mit einem Kerngrößenmaximum von 126 μ^2 bei 34% der Messungen.

5) Fixierungszeit: 5 Tage nach Behandlung (Abb.1).

Bei einer Fixierungszeit von 5 Tagen dagegen hat sich das Bild der Kerngrößenhäufigkeit bei kombinierter Behandlung (500R + Trenimon) völlig geändert (vgl.Fixierungszeit: 48 Stunden): Die Kurve zeigt deutlich

eine Abflachung und eine Verschiebung nach rechts, woraus eine durchschnittliche Kernvergrößerung bis zur Flächenverdoppelung (K2) zu erkennen ist. Vergleicht man nun den Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Kernflächen von Kontrollkultur und bei Trenimonbehandlung, der nahezu gleich ist, bei einer Fixierungszeit von 3 Stunden mit derjenigen von 5 Tagen, so zeigt sich nach dieser langen Behandlungseinwirkung nur ein geringer Unterschied hinsichtlich der Kerngrößenhäufigkeit. Demgegenüber ist der Kerngr[illegible]n-Verdoppelungsschritt, der bei einer Einwirkung von 3 und 9 Stunden nach Bestrahlung mit 500R vorliegt, bei einer Fixierungszeit von 5 Tagen nahezu aufgehoben.

Zusammenfassend sei hervorgehoben:

1) Bei der Häufigkeitsverteilung der Kernflächen von HeLa-Zellen konnten nach Co^{60}-Gammabestrahlung mit einer Einzeldosis von 500R nach einer Einwirkungszeit von 3, 9 und 48 Stunden zwei Kernklassen (K1 und K2) im Sinne einer Größenzunahme festgestellt werden: Bei einer Fixierungszeit von 3 Stunden haben 23% der Messungen eine Kerngröße von 158 μ^2, 19% von 251 μ^2. Bei einer Fixierungszeit von 9 Stunden haben 19% der Mes-

sungen eine Kerngröße von 126 μ^2, 13% von 251 μ^2.

2) Die Verdoppelungsschritte der Kernflächen nach Bestrahlung mit 500R treten mit zeitlichem Abstand von der Bestrahlung immer weniger deutlich hervor, d.h. der Effekt klingt ab.

3) Ein Effekt hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen von HeLa-Zellen nach Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung tritt erst nach einer Einwirkungszeit von 24 Stunden auf, und zwar mit fast kongruentem Kurvenverlauf für beide Behandlungsarten. Das Maximum der Kerngrößen von 158 μ^2 liegt bei 35% der Messungen vor und ist im Vergleich zu dem Wert der Kontrollen um 1/4 Kernklasse nach rechts verschoben.

4) Bei einer Fixierungszeit von 3 Stunden und 5 Tagen zeigt sich bei der Kontrollkultur und nach Trenimonbehandlung hinsichtlich der Kernflächenverteilung ein nahezu gleicher Kurvenverlauf.

4a) Nach 5 Tagen sind die Größenverschiebungen im Sinne einer Flächenverdoppelung bei den Kulturen, die mit Trenimon + 500R behandelt wurden, hervorzuheben.

5) Es zeigt sich eine Variabilität der Häufigkeits-

verteilung der Kernflächen von HeLa-Zellen zwischen den Kontrollkulturen verschiedener Fixierungszeiten. Sie kann durch mehrere Faktoren bedingt sein: Es machen sich unterschiedliche Zellzahlen durch Generationsfolgen bedingt und geringe Schwankungen in der Mediummenge bemerkbar. Außerdem sind Unterschiede u.a. darauf zurückzuführen, daß das Nährmedium nach 24 Stunden weniger verbraucht ist als nach 48 Stunden (P e t e r s,1960). (Vgl. in Abb.1: Fixierungszeit 24 und 48 Stunden).

B. Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen von HeLa-Zellen der Kontrollkultur, bei Bestrahlung mit 500R, Trenimonbehandlung (1:20 Millionen) und kombinierter Behandlung bei Fixierungszeiten von 3, 9, 24, 48 Stunden und 5 Tagen.

1) Fixierungszeit: 3 Stunden nach Behandlung (Abb.2).

In der halblogarithmischen Darstellung der Abb.2 bei einer Fixierungszeit von 3 Stunden ergibt die Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen einen nahezu kongruenten Kurvenverlauf bei der Kontrollkultur, bei Bestrahlung mit 500R und kombinierter Behandlung (500R + Trenimon). Bei einem Maximum von 43% bis 46% der Mes-

sungen beträgt die Nukleolengröße 9,8 μ^2. Ebenfalls bei diesem Wert liegt das Maximum der Nukleolen bei Trenimonbehandlung allein, und zwar mit 34% der Messungen. Die Nukleolen zeigen jedoch bei dieser Versuchsreihe gegenüber den beiden anderen eine durchschnittliche Verkleinerung, was aus der Linksverschiebung des Kurvenverlaufes eindeutig ersichtlich ist.

2) Fixierungszeit: 9 Stunden nach Behandlung (Abb.2).

Bei einer Fixierungszeit von 9 Stunden zeigt sich gegenüber derjenigen von 3 Stunden eine Linksverschiebung der Nukleolenflächenverteilung bei der Kontrollkultur um 1/4 Flächengröße, bei der Behandlung mit Trenimon und 500R + Trenimon um eine Klassengröße (N1/2), woraus eine durchschnittliche Nukleolenverkleinerung zu erkennen ist. Diese Abnahme der durchschnittlichen Nukleolenfläche tritt vor allem deutlich nach alleiniger Trenimonapplikation hervor. Im Gegensatz dazu ist bei Bestrahlung mit 500R die Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen mehr nach rechts verschoben. Die Andeutung eines zweiten Maximums bei 19,6 μ^2, was einem Verdoppelungsschritt entspricht (N2), läßt parallele Verläufe zu den Verdoppelungsschritten bei den Kernflächen erkennen. Bei Bestrahlung mit 500R, Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung ergeben 27%

bis 37% der Messungen eine Nukleolengröße von 9,8 μ^2.

3) Fixierungszeit: 24 Stunden nach Behandlung (Abb.2).

Auffallend ist bei der Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen der Effekt, der sich bei den Kulturen mit Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung nach einer Einwirkungszeit von 24 Stunden zeigt: Beide Kurven verlaufen, mit geringen Abweichungen, kongruent; bei einem Maximum von 42% der Messungen beträgt die Nukleolenfläche 9,8 μ^2. Bei der Kontrollkultur tritt die Flächenklasse N1/2 hervor, während nach Bestrahlung mit 500R sich gegenüber den besprochenen Ergebnissen bei einer Fixierungszeit von 9 Stunden keine wesentliche Änderung zeigt.

4) Fixierungszeit: 48 Stunden nach Behandlung (Abb.2).

Bei einer Fixierungszeit von 48 Stunden macht sich gegenüber einer Fixierungszeit von 24 Stunden bei der Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen bei Behandlung der Kulturen mit Trenimon und 500R + Trenimon kaum eine Abweichung bemerkbar; wiederum zeigt das Maximum der Nukleolen, d.h. hier 45% der Messungen, eine Größe von 9,8 μ^2. Ebenso ergibt sich bei den bestrahlten Kulturen kein wesentlicher Effekt; nur die

Kontrollkulturen weisen in ihren Nukleolengrößen eine Linksverschiebung um eine halbe Größenklasse und damit eine durchschnittliche Verkleinerung auf.

5) Fixierungszeit: 5 Tage nach Behandlung (Abb.2).

Wie aus der halblogarithmischen Darstellung der Werte nach einer Fixierungszeit von 5 Tagen ersichtlich ist, hat sich die Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen bei der Kombinationsbehandlung (500r + Trenimon) nicht wesentlich geändert. Das Maximum der Nukleolen (40% der Messungen) hat wieder eine Fläche von 9,8 μ^2. Beim Vergleich mit den Werten nach 48 Stunden zeigt sich dagegen bei alleiniger Trenimonapplikation hier eine deutliche Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilung, woraus eine durchschnittliche Verkleinerung der Nukleolen nach einer Einwirkungszeit von 5 Tagen gegenüber 24 und 48 Stunden zu ersehen ist. Ebenfalls eine Linksverschiebung der Häufigkeitsverteilung um eine Flächenklasse (N1/2) zeigt sich nach Bestrahlung mit 500R.

Zusammenfassend sollen folgende Ergebnisse hervorgehoben werden:

1) Aus der Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen

bei einer Fixierungszeit von 3 und 9 Stunden nach alleiniger Trenimonapplikation ergibt sich zunächst eine durchschnittliche Verkleinerung der Nukleolen gegenüber den Nukleolen aller anderen Behandlungsarten dieser Fixierungszeiten (Abb.2).

2) Bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden nach Behandlung mit Trenimon und 500R + Trenimon wird eine nahezu kongruente Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen deutlich (Abb.2).

3) Dieser kongruente Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen bei Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung bleibt auch bei einer Fixierungszeit von 48 Stunden bestehen (Abb.2).

4) Bei einer Fixierungszeit von 5 Tagen weist nur noch die Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen bei 500R + Trenimonbehandlung den Verlauf wie bei Fixierungszeiten von 24 und 48 Stunden auf. Dagegen ist nach Trenimonbehandlung allein die Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen nach links verschoben.

C. Mittlere Kern- und Nukleolengrößen von HeLa-Zellen bei Bestrahlung mit 500R, Trenimonbehandlung (1:20 Millionen) und kombinierter Behandlung bezogen auf den 3 - Stundenwert der Kontrollen (= 100%).

Um die Kern- und Nukleolengrößenänderung von HeLa-Zellen bei den einzelnen Versuchsreihen beurteilen und Kern- und Nukleolengrößen variationsstatistisch vergleichen zu können, wurden jeweils die mittleren Größen auf den 3 - Stundenwert der Kontrollen (=100%) bezogen und graphisch dargestellt (Abb.3).

Der Vergleich der Variationskurven der Kern- und Nukleolusflächen in den Kulturen zu verschiedenen Fixierungszeiten gibt bei den Kontrollwerten ein Bild der Stoffwechselvorgänge wieder, die in vitro ablaufen. Dabei ist der Verlauf der Variationskurven der Kern- und Nukleolusflächen der Kontrollkulturen über eine Versuchszeit von 5 Tagen weitgehend parallel; d.h. bei einem ungestörten Ablauf der Stoffwechselvorgänge zwischen Nukleolus und Zellkern bleiben die Flächenrelationen weitgehend konstant. Dies ist besonders hervorzuheben, da innerhalb der Versuchszeit Variationsfaktoren wie Änderungen der Populationsdichte, Verminderung des Nährstoffangebotes, Anrei-

cherungen von Stoffwechselendprodukten, pH-Wert-Änderungen u.a.m. eine Rolle spielen können.

Vergleicht man mit diesen Kontrollkurven die Werte, die nach einer Bestrahlung mit 500R erhalten wurden, so fällt vor allem das gegenläufige Verhalten von Kern- und Nukleolusfläche bis zum 24 - Stundenwert auf. Die Kernflächen fallen vom 3 - zum 9 - Stundenwert ab und steigen zum 24 - Stundenwert wieder an, während die Nukleolenflächen vom 3 - zum 9 - Stundenwert extrem ansteigen, um zum 24 - Stundenwert wieder abzufallen. Vom 24 - Stundenwert bis zum 5 - Tagewert ist eine gewisse Parallelität zwischen den Kern- und Nukleolenflächen erkennbar, wobei die Werte von beiden Meßreihen weit oberhalb der Werte der Kontrollen liegen. Dies ist unter Umständen auf eine Anreicherung von Zellen in der praemitotischen Phase zurückzuführen. Erst beim 5 - Tagewert findet eine Angleichung an die Werte der Kontrollen statt.

Unter dem Einfluß von Trenimon ist die nach Bestrahlung über 24 Stunden andauernde Dysproportion der Größenverhältnisse zwischen Kern und Nukleolus nicht festzustellen. Vielmehr bleibt die Parallelität der Größenrelationen zwischen Kern und Nukleolus über die ganze Versuchszeit erhalten. Hierbei sind die niederen Größen bei dem 3 - und 9 - Stundenwert,

die weit unter den Kontrollwerten liegen, besonders auffallend. Daraus ist zu entnehmen, daß Kern und Nukleolus unter dem Einfluß von Trenimon in ihrer Größe vermindert werden, was als eine Beeinträchtigung des Kern- wie des Nukleolarstoffwechsels gedeutet werden kann. Vom 24 - Stundenwert an ist die Parallelität zwischen den 500R - Werten und den Ergebnissen nach Trenimonapplikation bemerkenswert.

Der Vergleich der Ergebnisse nach Trenimonbehandlung und nach der Bestrahlung mit 500R läßt darauf schließen, daß beiden Noxen ein verschiedener Wirkungsmechanismus zukommt. Während unter der Einwirkung von Trenimon der Nukleolus- wie der Kernstoffwechsel gleichsinnig gehemmt werden, und zwar in einer Größenordnung, die weit unter den Kontrollwerten bei den 3 - und 9 - Stundenfixierungszeiten liegt, fällt nach der Bestrahlung in dieser Zeit nur die Kerngröße ab, während die Nukleolargröße steil ansteigt, um bei einer Einwirkungszeit von 24 Stunden auf den Ausgangswert zurückzugehen. Der vom 24 - Stundenwert an zu beobachtende weitgehend parallele Kurvenverlauf beider Versuchsreihen hinsichtlich der Kern- wie der Nukleolenflächen, sowie der Abfall der Werte auf die Normalgrößen beim 5 - Tagewert, läßt darauf schließen, daß die Wechselbeziehungen zwischen Nukleolus

und Kern nicht mehr gestört sind und die Wirkung bei den Interphasezellen in Form einer Größenzunahme nach 5 Tagen abgeklungen ist. Außerdem läßt sich aus diesem Verhalten entnehmen, daß trotz eines unterschiedlichen Reaktionsmechanismus zwischen der Bestrahlungs- und Trenimonwirkung die parallelen Kurvenverläufe vom 24 - Stundenwert an auf ein im Endeffekt ähnlich erscheinendes Reaktionsverhalten der Zellen zurückgeführt werden können.

Die Kombination der Wirkungen von Trenimon mit der Bestrahlung läßt bei den Kern- wie bei den Nukleolenflächen von 3 auf 9 Stunden einen Abfall der Werte erkennen; d.h. die unter der alleinigen Bestrahlungswirkung auftretende Nukleoluszunahme bleibt aus; vielmehr ist die Größenabnahme der Nukleolen unter der kombinierten Wirkung von Trenimon + 500R stärker als unter Trenimon allein. Die auf den 24 - Stundenwert zu feststellbare Zunahme der Kern- und Nukleolengrößen entspricht derjenigen nach Trenimonapplikation wie nach Bestrahlung, jedoch wird bei den Kerngrößen nur ein geringer Wert erreicht. Der zum 48 - Stundenwert erfolgende Abfall der Kern- und Nukleolengrößen spiegelt ein anderes Verhalten der Zellen wider. Diese veränderte Reaktionsweise kommt beim 5 - Tagewert noch deutlicher zum Ausdruck. Der

extreme Anstieg der Kerngrößen bei der kombinierten Behandlung und die entsprechende Größenzuordnung bei den Nukleolen weist auf eine anhaltende Schädigung der Zellen hin, die bei der alleinigen Trenimonbehandlung oder Bestrahlung nach diesem Zeitraum nicht mehr vorliegt.

Die Beziehung zwischen Kern- und Nukleolusgröße, die bei normalen Kulturen in einer Parallelität der Kurven zum Ausdruck kommt und die auch unter den Versuchsbedingungen nach Behandlung mit Trenimon und 500R vom 24 - Stundenwert ab zu beobachten ist, liegt nach einer kombinierten Behandlung nicht so deutlich vor. Dies Ergebnis könnte in der Weise gedeutet werden, daß die Wechselbeziehungen zwischen Kern und Nukleolus bzw. zwischen Nukleolus und Zellkern selbst bis zum 5 - Tagewert gestört verlaufen, sodaß auch aus diesem Befund auf eine längeranhaltende Wirkung der kombinierten Behandlung geschlossen werden kann. Aus dem starken Anstieg der Kerngrößen bei der kombinierten Behandlung nach einer Einwirkung von 5 Tagen kann gegebenenfalls auf einen Schädigungseffekt geschlossen werden, der zu einer vermehrten Riesenzellenbildung führt, jedoch nach alleiniger Trenimonapplikation oder Bestrahlung zu diesem Zeitpunkt nicht in Erscheinung tritt.

Die statistische Bearbeitung dieser Befunde führte zu folgenden Ergebnissen:

Kerne der HeLa-Zellen: Tab.1.

1) Bei den Fixierungszeiten von 3 und 9 Stunden konnte ein Unterschied der mittleren Kerngrößen von HeLa-Zellen mit einer Wahrscheinlichkeit von P = 0,27% statistisch gesichert werden:

a) Zwischen den Werten bei Bestrahlung der Kultur mit 500R und kombinierter Behandlung von 500R + Trenimon.

b) Zwischen den Werten bei Bestrahlung der Kultur mit 500R und alleiniger Trenimonapplikation.

2) Bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden liegen zwischen den verschiedenen Versuchsreihen keine signifikanten Kerngrößenunterschiede vor.

3) Bei den Fixierungszeiten von 48 Stunden und 5 Tagen bestehen signifikante Kerngrößenunterschiede (P= 0,27%) bei HeLa-Zellen:

a) Zwischen den Werten bei Bestrahlung der Kultur mit 500R und kombinierter Behandlung von 500R + Trenimon.

b) Zwischen den Werten bei alleiniger Trenimonbehandlung der Kultur und kombinierter Behandlung von 500R+ Trenimon.

Nukleolen der HeLa-Zellen: Tab.2.

Hinsichtlich der Nukleolengrößen konnten statistisch gesicherte Unterschiede (P=0,27%) nur bei folgenden Versuchsreihen festgestellt werden:

1) Zwischen den Werten bei alleiniger Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung nach einer Einwirkungszeit von 3 Stunden.

2) Zwischen den Werten bei alleiniger Trenimon- und 500R + Trenimonbehandlung nach einer Einwirkungszeit von 48 Stunden.

Die übrigen Werte der verschiedenen Versuchsreihen sind statistisch gegeneinander nicht zu sichern. Aus der graphischen Darstellung (Abb.3) können jedoch Tendenzen zur Änderung der Nukleolengröße - in der einen oder anderen Richtung - bei den verschiedenen Behandlungsarten der Kulturen entnommen werden.

I. Mittlere Nukleolengrößen von HeLa-Zellen in Prozent der entsprechenden Kerngrößen bei Bestrahlung mit 500R, Trenimonbehandlung (1:20Millionen) und kombinierter Behandlung bei Fixierungszeiten von 3, 9, 24, 48 Stunden und 5 Tagen.

Um die Änderung der Nukleolengrößen im Verhältnis zur Größenänderung der entsprechenden Kerne der verschiedenen Versuchsreihen bei den einzelnen Fixierungszeiten darzustellen, wurden die Nukleolengrößen in Prozent der entsprechenden Kerngrößen ($\frac{N \times 100}{K}$) ermittelt und graphisch dargestellt (Abb.4).

Aus der graphischen Darstellung ist ersichtlich, daß zwischen den Fixierungszeiten von 3 und 9 Stunden die relativ stärkste Größenzunahme der Nukleolen bei Bestrahlung der Kultur mit 500R vorliegt. Die relativ geringste Vergrößerung der Nukleolen tritt dagegen bei der Behandlung mit Trenimon auf. Inwieweit der starke Abfall vom 3 - auf den 9 - Stundenwert bei 500R + Trenimon als Effekt oder als normale Erscheinung zu deuten ist, kann aus den vorliegenden Ergebnissen nicht gesagt werden.

Zwischen den Fixierungszeiten von 24 und 48 Stun-

den treten bei der kombinierten Behandlung wie auch zum Teil bei der Trenimonbehandlung allein erhöhte Anteile der Nukleolenflächen gegenüber den Kernflächen auf, die über den Werten der Kontrollen und nach alleiniger Bestrahlung liegen. Unter Bezug auf die Darstellung der Kerngrößen in der Abb.3 sind die Werte zu diesen Zeitpunkten ebenfalls stark erhöht. Dieser Effekt scheint versuchsbedingt zu sein, ist jedoch nach 5 Tagen abgeklungen. Die mögliche Annahme, daß bei einer Kernvergrößerung der Nukleolus stärker zunimmt, als der normale Relationswert beträgt, wird durch den exzessiven 5 - Tagewert der Kerngröße der Reihe Trenimon + 500R widerlegt, bei dem zwischen der Nukleolusfläche und der Kernfläche die normale Relation erhalten ist. Aus dem Verlauf der Kurven kann entnommen werden, daß die Relation Nukleolus- zu Kernfläche auch unter Versuchsbedingungen relativ konstant ist; d.h. für intakt erscheinende Interphasezellen - und nur solche Kerne kamen zur Auswertung - ist das Verhältnis von Nukleolusfläche zu Kernfläche mit ein Kriterium ihrer Vitalität.

E. Häufigkeitsverteilung der Kernflächen von HeLa-Zellen bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden nach Einstrahlung von 250R, 500R und 1000R Co^{60} und in Kombination mit Trenimon.

Zur Darstellung von Dosiswirkungen auf die Kerne von HeLa-Zellen bei Bestrahlung mit 250R und 1000R sowie in Kombination mit Trenimon wurden die Variationskurven der Kernflächen nach Versuchszeiten von 9 bzw. 24 Stunden aufgetragen (Abb.5).

Die Effekte zeigen sich in einer deutlichen Verschiebung der Kurvenverläufe nach rechts bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden gegenüber 9 Stunden, was für eine durchschnittliche Kernvergrößerung spricht. Bei einer Fixierungszeit von 9 Stunden zeigt jeweils das Maximum der Kernmessungen (bei 250R: 23%, bei 250R + Trenimon: 30%) einen Wert von 126 μ^2. Bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden liegt das Maximum der Kernmessungen (35%) für beide Versuchsreihen bei einer Größe von 158 μ^2.

Bei den gleichen Versuchsbedingungen wie oben, jedoch nach Einstrahlung einer Dosis von 1000R, tritt die Verschiebung der Kurven für die Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen nach rechts, d.h. eine Kern-

größenzunahme, noch deutlicher hervor, vor allem bei der kombinierten Behandlung von 1000R + Trenimon nach einer Einwirkungszeit von 24 Stunden; 25% der gemessenen Kerne zeigen eine Größe von 185 μ^2. Bei alleiniger Bestrahlung dagegen haben 25% der Kerne eine Größe von nur 126 μ^2. Das Auftreten eines zweiten Gipfels bei der Verdoppelungsfläche K_2 (251 μ^2) ist im Sinne einer Anstauung von Kernen in der praemitotischen Wachstumsphase zu interpretieren.

F. Dosiseffekte an HeLa-Zellen unter Verwendung der mittleren Kerngrößen bei Bestrahlung der Kulturen mit Einzeldosen von 250R, 500R, 1000R und in Kombination mit Trenimon (1:20 Millionen).

Um die Dosiseffekte hinsichtlich der Kerngrößenänderung variationsstatistisch beurteilen zu können, wurden die mittleren Kernflächen der verschiedenen Versuchsreihen in Prozent der entsprechenden Kontrollgrößen ermittelt und bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden graphisch dargestellt (Abb.6a und 6b).

1) Einzeldosen von 250R,500R, 1000R (Abb.6a).

Der Verlauf der mittleren Kerngröße zeigt bei jeder

Einzeldosis mit zunehmender Fixierungszeit eine aufsteigende gerade Linie: Bei Bestrahlung mit 500R und 1000R ist sie steil, und beide Linien liegen nahezu parallel, wobei jedoch die Werte bei Bestrahlung mit 500R über denjenigen bei Bestrahlung mit 1000R liegen. Bei einer Einzeldosis von 250R dagegen ist aus der graphischen Darstellung nur eine geringe Zunahme der mittleren Kerngröße zu entnehmen. Wie aus Tab.3 ersichtlich, ist eine Größenzunahme der Kerne von He-La-Zellen bei Bestrahlung der Kultur mit Einzeldosen von 500R und 1000R signifikant (P=2%); bei Bestrahlung mit 250R kann dagegen nur eine Tendenz zur Kernvergrößerung angenommen werden, d.h.: Die strahlenbedingte Zunahme der Kerngröße ist dosisabhängig.

4) Einzeldosen von 250R, 500R, 1000R in Kombination mit Trenimon (1:20 Millionen). (Abb.4b).

Die mittlere Kerngröße nimmt bei jeder der drei Versuchsreihen mit zunehmender Fixierungszeit zu, was aus dem aufsteigenden Verlauf der Geraden ersichtlich ist. Die Gerade für die mittleren Kerngrößen bei 1000R+ Trenimonbehandlung zeigt den steilsten Verlauf und damit den deutlichsten Dosiseffekt. Die Gerade für die 250R + Trenimonbehandlung der Kultur zeigt wiederum

den flachsten Verlauf.

Die Differenzen der Mittelwerte der Kerngrößen bei einer Fixierungszeit von 9 und 24 Stunden sind bei der Behandlung mit 1000R + Trenimon und 500R + Trenimon signifikant, und zwar mit einer Wahrscheinlichkeit von P=0,27% (Tab.3). Bei Behandlung der Kultur mit 250R + Trenimon ist, wie auch bei alleiniger Bestrahlung mit 250R, nur eine Tendenz zur Kernvergrößerung ersichtlich.

Weiterhin ist, wie Tab.3 zu entnehmen, die mittlere Kerngröße bei Behandlung der Kultur mit 500R + Trenimon gegenüber derjenigen bei Behandlung der Kultur mit 1000R + Trenimon bei einer Einwirkungszeit von 24 Stunden nicht zu sichern. Ein signifikanter Unterschied (P=2%) besteht jedoch zwischen den mittleren Kerngrößen bei 250R + Trenimonbehandlung einerseits und 1000R + Trenimonbehandlung andererseits bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden.

Zusammenfassend ergab sich,

1) daß bei Behandlung der Kultur mit 250R und 250R + Trenimon noch keine signifikante Kernvergrößerung, sondern nur eine Tendenz dazu, vorliegt.

2) daß bei Behandlung der Kultur mit 500R und 1000R -

jeweils einzeln und in Kombination mit Trenimon (1:20 Millionen) - die Kernvergrößerung signifikant ist, wobei mit zusätzlicher Trenimonapplikation noch ein steigernder Effekt hinsichtlich der Größenzunahme ersichtlich ist. (Vgl. Abb. 6a mit 6b und in Tab. 3: P=2% mit P=0,07%).

Kernvergrößerung als strahlenbedingter Effekt tritt unter der Einwirkung von Trenimon mit steigender Bestrahlungsdosis deutlicher hervor als mit steigenden Dosen allein, was auf eine additive Wirkung zurückgeführt werden kann.

c. Häufigkeitsverteilung der Nukleolenflächen von HeLa-Zellen bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden nach Bestrahlung von 250R, 500R und 1000R Co^{60} - und in Kombination mit Trenimon.

Vergleicht man die oben angeführten Ergebnisse nach Einwirkung von 500R Co^{60} (Abb.2) mit dem Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen bei Bestrahlung mit 250R und kombinierter Behandlung (250R + Trenimon) und Fixierungszeit von 9 und 24 Stunden (Abb.7), so ist auch hier der geringe Effekt hinsichtlich einer Größenänderung der Nukleolen zu erkennen.

Bei einer Dosis von 1000R und 1000R + Trenimon ergibt sich jedoch aus der Rechtsverschiebung des Kurvenverlaufes bei einer Fixierungszeit von 24 Stunden gegenüber 9 Stunden deutlich eine von der Einwirkungszeit abhängige Nukleolenvergrößerung, die bei der alleinigen Bestrahlungswirkung sowie bei der kombinierten Behandlung (1000R + Trenimon, Fixierungszeit: 24 Stunden) eindeutig ist. (Vgl. mit Abb. 2 und Tab. 4).

H. Dosiseffekte an HeLa-Zellen unter Verwendung der mittleren Nukleolengrößen bei Bestrahlung der Kulturen mit Einzeldosen von 250R, 500R, 1000R und in Kombination mit Trenimon (1:20 Millionen).

Wie zur Beurteilung der Dosiseffekte an den Zellkernen wurden auch hier entsprechend die mittleren Nukleolengrößen in Prozent der zugehörigen Kontrollwerte ermittelt und bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden graphisch dargestellt (Abb. 8a und 8b).

1) Einzeldosen von 250R 500R, 1000R (Abb.8a).

Bei Bestrahlung der Kultur mit einer Einzeldosis von 500R ist aus der graphischen Darstellung mit zunehmender Fixierungszeit eine Abnahme der mittleren Nuk-

leolengröße ersichtlich. Bei Bestrahlung mit 250R ist kein Effekt hinsichtlich einer Änderung der Nukleolengröße und bei Bestrahlung mit 1000R ist mit steigender Fixierungszeit eine Zunahme der mittleren Nukleolengröße feststellbar. Es liegen jedoch bei allen drei Versuchsreihen hinsichtlich der Größenänderung der Nukleolen nur Tendenzen vor, die statistisch nicht gesichert werden konnten (Tab.4). Die unterschiedlichen Werte nach den verschiedenen Dosen könnten unter Hinweis auf den Verlauf nach Bestrahlung mit 500R (Abb.4) auf einen zeitlich anderen Kurvenverlauf nach Einstrahlung von 250R oder 1000R zurückzuführen sein, sodaß hier der Zeiteffekt hineinspielt.

- [illegible] 250R, 500R, 1000R in Kombination mit Trenimon (1:20 Millimol). (Abb.5b).

Bei der Kombinationsbehandlung der Kultur mit 1000R+ Trenimon ergibt sich - gegenüber der alleinigen Bestrahlung mit 1000R - eine statistisch zu sichernde Zunahme der mittleren Nukleolengröße mit fortschreitender Fixierungszeit , und zwar mit einer Wahrscheinlichkeit von P=1% (Tab.4). Bei einer Behandlung der Kultur mit 250R + Trenimon und 500R + Trenimon ist [illegible] eine Tendenz zur Zu-

nahme der mittleren Nukleolengröße ersichtlich, die nicht gesichert werden konnte. Es war auch nicht möglich, einen Unterschied zwischen der mittleren Nukleolengröße bei Behandlung der Kultur mit 250R + Trenimon und derjenigen bei 1000R + Trenimon nach einer Einwirkungszeit von 24 Stunden zu sichern, was aus der graphischen Darstellung hätte angenommen werden können.

Damit ergibt sich aus oben angeführten Befunden, daß ein gesicherter Dosiseffekt an den Nukleolen von HeLa-Zellen hinsichtlich einer Größenänderung nur bei Behandlung der Kultur mit 1000R + Trenimon vorliegt, wobei dem Trenimon wieder eine effektsteigernde Wirkung zukommt.

I. Dosiseffekte an HeLa-Zellen unter Verwendung der mittleren Nukleolengrößen in Prozent der Kerngrößen bei Bestrahlung der Kulturen mit Einzeldosen von 250R, 500R, 1000R und in Kombination mit Trenimon (1:20 Millionen).

Um außerdem den Dosiseffekt an den Nukleolengrößen im Verhältnis zu den Kerngrößen beurteilen zu können, wurden die mittleren Nukleolengrößen der ver-

schiedenen Versuchsreihen in Prozent der entsprechenden Kerngrößen ($\frac{N \times 100}{K}$) bei den Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden ermittelt und ihr Verlauf graphisch dargestellt (Abb.9a und 9b).

Vergleicht man Abb.8a und 9a miteinander, so zeigt sich bei Bestrahlung der Kultur mit Einzeldosen von 250R, 500R und 1000R hinsichtlich des Dosiseffektes an den Nukleolen - einerseits die mittlere Nukleolengröße in Prozent der Kontrollgröße (Abb.8a), andererseits die mittlere Nukleolengröße in Prozent der zugehörigen Kerngröße (Abb.9a) - kein Unterschied, d.h. die Nukleolen machen die Größenveränderung der Kerne mit.

Die Abb.9b zeigt den Dosiseffekt an den Nukleolen (mittlere Nukleolengröße in Prozent der entsprechenden Kerngröße) bei kombinierter Behandlung der Kultur. Hier zeigt sich bei 250R + Trenimonbehandlung gegenüber Abb.8b ein umgekehrter Effekt, nämlich eine Tendenz zur Abnahme der mittleren Nukleolengröße.

Aus den Dosiseffektversuchen kann gefolgert werden, daß mit zunehmender Dosis von 250R bis 1000R erst bei der hohen Dosis signifikante Unterschiede auftreten, deren Tendenz bei den niederen Dosen in Erscheinung tritt. Die bei der kombinierten Behand-

lung von Trenimon + Bestrahlung auftretende Effekt-
steigerung ist jedoch deutlich erkennbar.

IV. Diskussion:

Die Verwendung von HeLa-Zellen für die Untersuchung der Wirkung von Co^{60}-Gammastrahlen und Trenimon - einzeln und in Kombination - hat zu folgenden Ergebnissen geführt: Bei der Häufigkeitsverteilung der Kernflächen von HeLa-Zellen traten bei Bestrahlung der Kultur mit 500R nach einer Einwirkungszeit von 3 und 9 Stunden zwei Kernklassen deutlich hervor, was möglicherweise auf einer Mitosehemmung beruht. Darauf soll nur insoweit eingegangen werden, als erwähnt wird, daß sich schon nach Dosen von wenigen R eine Mitoseverzögerung oder ein temporärer Mitosestopp z.B. an der Rattenkornea erkennen läßt; besonders diejenigen Zellen, welche sich im letzten Teil der Interphase oder in der frühen Prophase befinden, werden zu einem von der Dosis abhängigen Zeitraum am Eintritt in die Mitose gehindert.

Die Untersuchungen an den Kernen von HeLa-Zellen führten weiterhin mit einem gesicherten Ergebnis zur Bestätigung einer von der Strahlendosis und der optimalen Einwirkungszeit abhängigen Kernvergrößerung, welche ein allgemeines und früh nachweisbares Kriterium nach einem Strahleninsult ist.

Die Frage der Angriffspunkte der Bestrahlung im

Bereich der Zellorganelle ist durch cytologische und biochemische Methoden untersucht worden. Trotzdem liegen wenig experimentelle Aussagen darüber vor, was sich in der Zelle bzw. dem Zellkern direkt nach der Bestrahlung abspielt. Das Kriterium der Strahlenwirkung ist ja nicht allein an die Zellteilung gebunden, sondern energiereiche Strahlen sind auch an ruhenden Zellen bzw. Kernen wirksam, wie in den vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden konnte, und zwar im Sinne einer Kernvergrößerung. Bedeutsam ist weiterhin der Nachweis, daß die Strahlenwirkung direkt von der Dosis und auch von der Wellenlänge abhängig ist. Außerdem spielt der Zeitfaktor eine entscheidende Rolle und auch das Volumen des Bestrahlungsobjektes.

Hinsichtlich der Strahlenwirkung an Zellen wird die Treffertheorie diskutiert (L e a, 1946; T i m o f é e f f - R e s s o v s k y und Z i m m e r, 1947), welche besagt, daß es bei den Ionisationsvorgängen im zellulären Bereich auf einen Mikrobezirk ankommt, der getroffen sein muß, wenn sich der "Treffer" biologisch als Strahlungseffekt manifestieren soll.

S c h e i b e konnte 1939 erstmals zeigen, daß der Ort eingestrahlter Energie nicht unbedingt mit dem Ort der Strahlenwirkung identisch sein muß. Durch Energieleitung oder Diffusion kann die absorbierte

Energie zu einer empfindlichen Stelle der biologischen Einheit wandern. Man spricht in diesem Zusammenhang vergleichend von direktem und indirektem "Treffer" (R a j e w s k y, 1952; D a l e, 1949 und 1952). Für die Richtigkeit dieser Vorstellung liegen viele Ergebnisse vor (z.B. F a b e r g e 1950; H o u t e r m a n s, 1954), woraus die Bedeutung des indirekten Treffers ersichtlich ist.

Die Energiegewinnung der Zelle läuft unter Beteiligung katalysierender Fermentsysteme ab, und so ist das Verhalten dieser Fermentsysteme nach Strahlenbeeinflussung von Wichtigkeit. Die Inaktivierung der Enzymmoleküle soll durch diffundierende Energieträger erfolgen (H o b i t z, 1963).

Die für den Erhaltungsstoffwechsel erforderliche Energie gewinnt die Zelle durch Oxydation des Wasserstoffs über die Atmungskette des Zytochrom-Zytochromoxydase-Systems. Die Speicherung der gewonnenen Energie erfolgt in energiereichen Phosphatbindungen. Wie Versuche zur direkten Beeinflussung der biologischen Oxydation durch ionisierende Strahlen jedoch zeigen, werden die energieliefernden Reaktionen durch Strahlendosen bis 1000R nicht beeinflußt (S o e l l, 1952). Ebenfalls erst noch sehr hohen Dosen, von 10^4R bis 10^5R,

werden Störungen der oxydativen Phophorylierung nachweisbar (R a j e w s k y und Mitarbeiter, 1957). Über strahlenbedingte Hemmung der oxydativen Phosphorylierung ist bei der Milz und dem Thymus berichtet worden (van B e k k u m, 1955). Schnellwachsende Gewebe wie das Tumorgewebe haben eine hohe Stoffwechselaktivität und, wie strahlenbiologisch bekannt ist, weist Gewebe mit hoher Zellneubildungsrate auch eine hohe Strahlenempfindlichkeit auf. Daraus war zu schließen, daß der primäre biologische Angriffspunkt ionisierender Strahlung im Protein- und Nukleinsäure-Stoffwechsel liegen muß.

Bei der kontinuierlichen Bestrahlung (mit Gammastrahlen von 35R/min) von Bact. coli in der exponentiellen Wachstumsphase konnte gezeigt werden, daß die Teilungsvorgänge rasch sistieren, die Masse des Zytoplasmas dagegen weiter zunimmt (L e a und Mitarbeiter, 1937). Daraus ließ sich weiterhin der Schluß ziehen, daß nach einer Röntgenbestrahlung die Proteinsynthese und damit die Synthese der Ribonukleinsäure (RNS) weiterläuft, während mit dem Sistieren der Teilungsaktivität die Desoxyribonukleinsäure-Synthese (DNS) zum Stillstand kommt. Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten von K l e i n und F o r s s b e r g (1954), P a s o n e a u (1955), E u l e r und H e v e s y

('Oll' bestätigt. Die Ursache der Hemmung der DNS-Synthese scheint an einer Hemmung der Desoxynukleosidtriphosphatase zu liegen. Möglicherweise ist auch die Duplikation der Helix gehemmt (P e t e r s, 1960). Damit wird heute zu Recht die Hemmung der DNS-Synthese als der zur Zeit faßbare wesentliche primäre Vorgang beim Zustandekommen eines Strahlenschadens angesehen.

Die hervorgerufenen Stoffwechselstörungen der Zellen sind Vorgänge, die schon primär als Katabiosen beginnen oder enden; sie sind Änderungen im Stoffwechselgeschehen der Zellen, die sich quantitativ-qualitativ oder zeitlich-dynamisch auswirken können (L e t t e r e r, 1959). In diesem Sinn ist auch die durch Strahleneinwirkung hervorgerufene Kernschwellung zu verstehen, wobei auch das "Phänomen der trüben Schwellung" an der Zelle als solcher, die Änderung der intrazellulären osmotischen - und Permeabilitäts-Verhältnisse zu berücksichtigen sind.

Da bei Trenimonapplikation (1:20 Millionen) eine nahezu gleiche Kerngrößenänderung bei den HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Einwirkungszeit (von 24 Stunden bis 5 Tagen) wie bei einer Bestrahlung der Kultur mit 500R festgestellt wurde (Abb.3), so kann [illegible] Trenimon möglicher-

weise auch in den Protein- und Nukleinsäurestoffwechsel eingreift. Vergleichende Ergebnisse liegen bisher nicht vor, was auch aus folgenden Worten zu entnehmen ist: "Die genaue Bewertung der Chemotherapie für menschliche Tumoren steht für fast alle heute verfügbaren Zytostatika noch aus." (D o m a g k, 1959). Hervorgehoben soll außerdem werden, daß man es bei der Anwendung chemisch zellschädigender Substanzen mit verschiedenen Möglichkeiten des Angriffs an der Zelle zu tun haben kann - im Gegensatz zur Strahlenanwendung, wobei letztlich nur das Eindringen der ionisierenden Strahlen und eine intrazelluläre Ionisation vorliegt. Einige Angriffsmöglichkeiten an der Krebszelle seien erwähnt (B a u e r, K.H., 1963):

1) Eingriff in den Zellteilungsmechanismus, z.B. durch Mitosegifte.

2) Zellschädigung durch mutagene Stoffe.

3) Wachstumshemmung durch Stoffwechselantagonisten bei der Nukleinsäure-Synthese.

4) Hervorrufen von Wachstumsstörungen durch bestimmte Antibiotika.

5) Zellschädigung durch mehrere gleichzeitige oder

aufeinanderfolgende Einwirkungen (Prinzip der Syncarcinokolyse).

Trenimon gehört zu den Äthylimino-Verbindungen, die den N-Lost-Substanzen strukturell ähnlich sind. Diese werden ihrem wahrscheinlichen Angriffspunkt nach auch als alkylierende Substanzen geführt; von ihnen ist bekannt, daß sie in die Synthese der Desoxyribonukleinsäure eingreifen (B a u e r, K.H., 1963). Eine Folgerung ist, daß auch das Trenimon möglicherweise in die DNS-Synthese der Zelle eingreift - genauso wie ionisierende Strahlen. Diese Annahme wurde von L i s s und P a l m e (1963) bestätigt, die fanden, daß eine zweistündige Einwirkung von Trenimon auf Ascites-Tumorzellen den Einbau von 3H-Thymidin hemmt, während zu diesem Zeitpunkt der DPN-Gehalt und die Glykolyse noch nichtbeeinflußt waren. D o m a g k (1960) spricht von einer wahrscheinlichen Zerstörung der "Produktionszentren der Nukleinsäuren". Von P ü t t e r (1960, 1961) wurden an Tumorzellen Untersuchungen über Stoffwechselwirkungen mit Trenimon, besonders Atmung und Glykolyse betreffend, durchgeführt, von B i e r l i n g (1960) an Gewebekulturen. Bei einem anderen Äthyleniminochinon, dem "Bayer E_{39}", ließ sich eine deutliche Hemmung von Atmung und Glykolyse aller

untersuchten Zellarten in vitro nachweisen (B u s c h, 1957).

Bei der kombinierten Behandlung (500R+Trenimon) der HeLa-Zellen zeigte sich zunächst eine mit den jeweiligen Einzelbehandlungen bis zu einer Einwirkungszeit von 24 Stunden ähnliche Kerngrößenänderung, wobei die Werte bei kombinierter Behandlung zwischen denjenigen bei Einzelbehandlung liegen (Abb.3). Man kann bis dahin noch nicht von einem additiven Effekt bei der kombinierten Behandlung sprechen. Im Gegensatz zu den Kernflächen verhalten sich die Flächen der Nukleolen bei den Einzelbehandlungen umgekehrt. Während nach der Bestrahlung bis zum 9 - Stundenwert eine extreme Größenzunahme vorliegt, ist nach Trenimonapplikation eine Größenabnahme festzustellen, wie sie auch B i e r l i n g (1960) an seinen Gewebekulturen beobachtet hat. Dieses Verhalten läßt die Annahme zu, daß beide Noxen einen unterschiedlichen Wirkungsmechanismus besitzen.

Vom 24 - Stundenwert an sind die parallelen Kurvenverläufe der Kern- und Nukleolengrößen der Bestrahlungsreihe und der Trenimonreihe auffallend. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch zu der Annahme eines unterschiedlichen Reaktionsmechanismus, da die untersuchten Kriterien: Kern- und Nukleolusgröße auf

verschiedene Noxen durchaus gleichsinnig reagieren können. Die Kombinationsversuche von 500R+Trenimon lassen im Zeitraum von 24 bis 48 Stunden bereits einen anderen Verlauf als die Einzelbehandlungen erkennen. Diese veränderte Reaktionsweise kommt beim 5 - Tagewert deutlich zum Ausdruck. Der extreme Anstieg der Kern- und Nukleolengrößen bei der Kombinierten Behandlung weist auf eine langanhaltende Schädigungswirkung hin, die bei alleiniger Trenimonbehandlung oder Bestrahlung nicht mehr vorliegt. Dieses im Sinne einer Wirkungsverlängerung zu deutende Verhalten bestätigt die Annahme der verschiedenen Wirkungsmechanismen. Außerdem konnte bei der statistisch gesicherten, von der Strahlendosis abhängigen Kernvergrößerung, durch zusätzliche Trenimonapplikation eine Steigerung dieser Effekte beobachtet werden, die ebenfalls im Sinne einer additiven Wirkung zu deuten ist.

Auf die Tatsache, daß schon unspezifische chronische Gewebereize den "Schwellenwert" einer Strahlendosis herabsetzen können, haben S h u b i k und Mitarbeiter (1952) hingewiesen. Andererseits führen verschiedene Pharmaka, welche in den Nukleinsäurestoffwechsel eingreifen, zugleich zu einer Steigerung der Strahlenempfindlichkeit (H a r b e r s, 1962). Es be-

steht damit die berechtigte Annahme, daß auch Trenimon durch seinen Eingriff in den Nukleinsäure-Stoffwechsel zugleich eine Strahlensensibilisierung bewirkt.

Der Wirkungsmechanismus der Strahlensensibilisierung durch chemische Substanzen ist nicht einheitlich. Pyrimidinanaloge, die anstelle von Thymin in die DNS eingebaut werden, bewirken in der Gewebekultur und bei Mikroorganismen eine Zunahme der Strahlenempfindlichkeit (K a p l a n und Mitarbeiter, 1961; E r i k s o n und Mitarbeiter, 1961). Bei anderen chemotherapeutisch hochwirksamen Pharmaka, wie Uracil- oder Desoxyuridinanaloge, die nicht in die DNS eingebaut werden, liegt noch kein eindeutiges Ergebnis vor, ob es sich bei der Kombinationsbehandlung um einen additiven Effekt oder eine echte Strahlensensibilisierung handelt (H a r b e r s, 1962). Diese Untersuchungen wurden tierexperimentell durchgeführt.

Aus der Klinik liegen bisher nur wenige Berichte über Kombinationsbehandlungen mit ionisierenden Strahlen und "Antimetaboliten" vor, die in den Nukleinsäurestoffwechsel eingreifen (z.B. bei: S i l l e t t und Mitarbeiter, 1961), da sich von den experimentell erzielten Effekten in der praktischen Strahlentherapie von Neoplasmen wegen der sehr hohen

erforderlichen Konzentration der Basenanaloge kaum Gebrauch machen läßt (K r i s s, 1961). Die zentrale Stellung der Nukleinsäure steht jedoch hinsichtlich der Auswirkung von Schäden durch ionisierende Strahlen und chemische Substanzen außer Zweifel.

In den Ergebnissen der Untersuchungen über die Größenänderung der Nukleolen von HeLa-Zellen bei Bestrahlung mit 500R und Trenimonbehandlung - einzeln und in Kombination - wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt, außer zwischen den Werten der Nukleolengrößen bei Trenimonbehandlung allein und 500R + Trenimonbehandlung bei einer Fixierungszeit von 3 und 48 Stunden.

Hinsichtlich der Dosiseffekte bei Bestrahlung der Kultur mit 250R, 500R und 1000R sind auch hier die Größenunterschiede der Nukleolen nicht signifikant. Bei Bestrahlung mit 1000R ist lediglich eine Tendenz zur Vergrößerung zu erkennen (Abb.8a), die bei zusätzlicher Trenimonapplikation (Abb.8b) gesichert werden konnte (Tab.4). Daraus ist wieder die effektsteigernde Wirkung des Trenimons zu entnehmen, wenngleich sie an den Nukleolen hinsichtlich einer sekundären Größenzunahme nicht so deutlich zum Ausdruck kommt wie an den Kernen. Möglicherweise beein-

flußte die relativ viel höhere Streuung der Nukleolengrößen gegenüber den Kerngrößen die vorliegenden Ergebnisse. Im allgemeinen lassen die Nukleolen eine relativ große Strahlensensibilität erkennen, die unter bestimmten Versuchsanordnungen, wie z.B. Mikrobestrahlung (G a u l d e n und P e r r y, 1958), noch diejenige der Zellkerne übertrifft. Gelegentlich wurde eine Größenzunahme der Nukleolen unter der Einwirkung einer intrazellulären Bestrahlung durch inkorporiertes P-32 festgestellt (P e t e r s, 1963). D u r y e e (1947 und 1949) konnte eine Größenzunahme an Ovarienzellen von Salamandern beobachten, wobei er eine Zunahme um den Faktor 2 ermittelte. S c h e r e r, R i n g l e b und V e n t z k e (1953) konnten an Milz, Knochenmark und Ascitestumoren weißer Mäuse eine dosisabhängige Zunahme der Nukleolenhäufigkeit zeigen, wobei der Vergrößerungseffekt als Akkumulierung von RNS bzw. RNP gedeutet wird. Von I v e r s o n und S t a f f o r d (1962) wird darauf hingewiesen, daß möglicherweise nicht nur die Synthesevorgänge der RNS-Vorstufen durch Bestrahlung beeinflußt werden, sondern auch die Transport- und Passagevorgänge.

Das Auftreten von Wachstums-Verdoppelungsschritten in den Variationskurven der Kerngrößen nach der

Bestrahlung mit 500R bei den Fixierungszeiten von 3, 9 und 48 Stunden sowie bei der kombinierten Behandlung von Trenimon + 500R beim 5 - Tagewert lassen eine Deutung im Sinne von K i l l a n d e r und Mitarbeitern (1962) zu. Diese Autoren fanden an Hand von mikrospektro-photometrischen Messungen nach Bestrahlung im Mäuseascites eine Kernvolumenzunahme sowie eine Nukleolarsubstanzsteigerung, wobei die DNS-Synthese bis zum praemitotischen Wert, d.h. also bis zur Kernklassenverdoppelung, weiterlief. Außerdem wurde ein vermehrter Übertritt von nukleolärer Substanz in das Zytoplasma nach der Bestrahlung beobachtet (P a r c h w i t z, 1957; G r o p p und H u p e, 1958; W e n d t, 1959).

Oben angeführte Ergebnisse zeigen, daß sich Strahlenreaktionen in Form von Größenänderungen am Nukleolus manifestieren, die bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit, wie schon erwähnt, nur in einer Tendenz zur Größenzunahme zum Ausdruck kommen. Für die Diskrepanz der Ergebnisse können mehrer Faktoren verantwortlich sein. Die große Streubreite der Nukleolengrößen von HeLa-Zellen wurde schon erwähnt.

Was die Beeinflussung des Nukleolarapparates durch chemische Substanzen betrifft, so konnte eine

Größenzunahme nach der Einwirkung von Senfgas (B o d e n s t e i n, 1947) und Thioacetamid (K l e i n f e l d und v. H a a m, 1959) beobachtet werden. Über die Wirkung von Trenimon hinsichtlich einer Größenänderung der Nukleolen kann wiederum nur soviel gesagt werden, daß es primär eine Verkleinerungs- und sekundär eine Vergrößerungstendenz hervorruft. Gleichzeitig besitzt es eine effektsteigernde Wirkung bei Anwendung in Kombination mit Co^{60}-Gammastrahlen. Jedoch kann eine Vergrößerungs- oder Verkleinerungstendenz bei den Nukleolen nur im Vergleich zu den entsprechenden Kerngrößen beurteilt werden, sodaß isolierte nur an den Nukleolen vorgenommene Messungen keinen großen Aussagewert besitzen.

Bei einem Vergleich der vorliegenden Untersuchungsergebnisse an den Kernen und Nukleolen von HeLa-Zellen in der Interphase hinsichtlich ihrer Größenänderung bei Anwendung von Co^{60}-Gammastrahlen und Trenimonbehandlung - einzeln und in Kombination - ergab sich ein Unterschied in ihrer Sensibilität gegenüber diesen schädigenden Einflüssen. Die Effekte sind an den Kernen signifikant, an den Nukleolen dagegen kaum, was evt. weitere vergleichende Untersuchungen notwendig machen könnte.

V. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Co^{60}-Gammastrahlen und Trenimon - einzeln und in Kombination - auf den Interphasekern von Krebszellen (Stamm: HeLa) in vitro untersucht. Als Wirkungskriterien kamen planimetrische Messungen der Kerne und ihrer darin enthaltenen Nukleolen zur Anwendung. Die Kulturen wurden mit Einzeldosen von 250R, 500R und 1000R Co^{60} bestrahlt. Trenimon wurde immer in einer Konzentration von 1:20 Millionen verwendet. Um den zeitlichen Ablauf der durch diese Noxen hervorgerufenen Veränderungen zu erfassen, wurden Fixierungszeiten von 4, 9, 24, 48 Stunden und 5 Tagen gewählt. Die Auswertung der Variationskurven der Kern- und Nukleolusflächen sowie der mittleren Kern- und Nukleolenflächen führte zu folgenden Ergebnissen:

Die in den vorliegenden Versuchen ermittelten Variationskurven der Kernflächen sind durch ein Maximum bei 100 μ^2 und die Nukleolenflächen durch ein Maximum bei 9,8 μ^2 charakterisiert. Hieraus errechnet sich der Flächenanteil der Nukleolen an der Kernfläche mit durchschnittlich 7,7%.

2) Verdoppelungsschritte der Kerngrößen im Sinne einer Polyploidisierung traten in den Kulturen nach einer Bestrahlung mit 500R bei den 3-, 9- und 48-Stundenwerten auf. Unter der kombinierten Einwirkung von 500R Co^{60} mit Trenimon wurden Verdoppelungsschritte beim 5 - Tagewert festgestellt.

3) Die Veränderungen der Nukleolengrößen, die mit den Kerngrößen bei den Kontrollkulturen weitgehend synchron verlaufen, sind besonders nach der Bestrahlung auffallend. Während die Zellkerne bei den Fixierungszeiten von 3 und 9 Stunden eine Verkleinerung aufweisen, steigt der Flächenanteil der Nukleolen beim 9 - Stundenwert von 7,7% auf 15,8%. Diese strahlenbedingte Vergrößerung des Nukleolarapparates ist nach 24 Stunden abgeklungen.

4) Unter dem Einfluß der kombinierten Behandlung von Trenimon mit der Bestrahlung tritt dieser Effekt nicht auf, vielmehr bleibt der unter der Einwirkung von Trenimon ersichtliche Effekt der Nukleolusverkleinerung bis zum 9 - Stundenwert bei der kombinierten Behandlung erhalten.

5) Die Veränderungen der Kern- und Nukleolenflächen,

die bei alleiniger Anwendung von Trenimon oder Bestrahlung nach 5 Tagen abgeklungen sind, bleiben unter der kombinierten Behandlung in Form von Kern- und Nukleolengrößenzunahmen erhalten.

6) Aus dem unterschiedlichen Verhalten der Nukleolengrößen nach Bestrahlung und Trenimonbehandlung wird auf verschiedene Angriffspunkte im Zellstoffwechsel geschlossen. Diese Annahme erhält durch den wirkungssteigernden Effekt der kombinierten Behandlung von Trenimon mit der Bestrahlung eine Bestätigung.

7) Eine signifikante, dosisabhängige Kernvergrößerung wurde unter Verwendung der Werte bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden nach Bestrahlung der HeLa-Zellen mit Einzeldosen von 500R und 1000R festgestellt; dagegen war nach einer Dosis von 250R nur eine Vergrößerungstendenz zu beobachten.

8) Bei den entsprechenden Fixierungszeiten und nach Strahlendosen von 250R, 500R und 1000R waren bei den Nukleolen keine signifikanten Veränderungen zu ermitteln; eine Vergrößerungstendenz ließ sich ablesen.

9) Bei den jeweiligen Einzeldosen von 250R, 500R und 1000R Co^{60} in Kombination mit Trenimon wurde bei den Kernen eine signifikante Größenzunahme in allen Dosisbereichen und bei den Nukleolen bei einer Behandlung von 1000R + Trenimon festgestellt.

Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, daß die Behandlung der Gewebekulturen mit Co^{60}-Gammastrahlen im Vergleich zur Anwendung von Trenimon an den Interphasezellen Reaktionsunterschiede erkennen läßt, die sich innerhalb der ersten 24 Stunden nach Beginn der Einwirkungszeit manifestieren. Die Kombination beider Noxen bestätigt die Annahme der verschiedenen Wirkungsmechanismen, da ein additiver Effekt in Form einer Wirkungsverlängerung zum Ausdruck kommt. Die nach der Bestrahlung mit verschiedenen Dosen auftretenden dosisabhängigen Effekte an den Kern- wie den Nukleolengrößen werden bei der kombinierten Co^{60}-Bestrahlung mit Trenimon noch deutlicher. Dieses Ergebnis spricht ebenfalls für eine Steigerung der Strahlenwirkung durch Trenimon.

VI. Anhang:

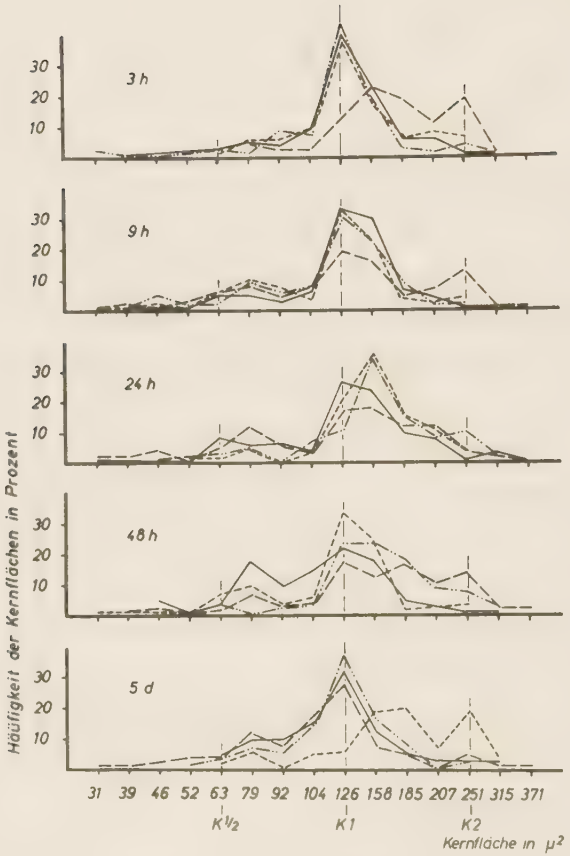

Abb.1: Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen von HeLa-Zellen bei Fixierungszeiten von 3, 9, 24, 48 Stunden und 5 Tagen.

Ordinate: Häufigkeit der Kernflächen in %.
Abszisse: Kernfläche in μ^2 (logarithm. Maßstab).

Kontrolle: ———— Trenimon: —·.—·.—
500R : — — — 500R+Tren: ----------

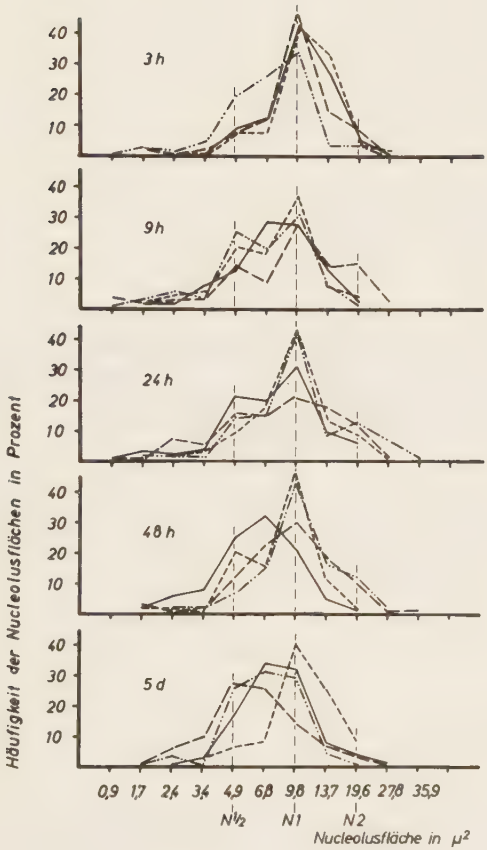

Abb.2: Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen von HeLa-Zellen bei Fixierungszeiten von 3, 9, 24, 48 Stunden und 5 Tagen.

Ordinate: Häufigkeit der Nukleolenflächen in %.
Abszisse: Nukleolusfläche in μ^2 (log. Maßstab).

Kontrolle: ——— Trenimon: —..—..—
500R :— — — 500R+Tre.: ----------

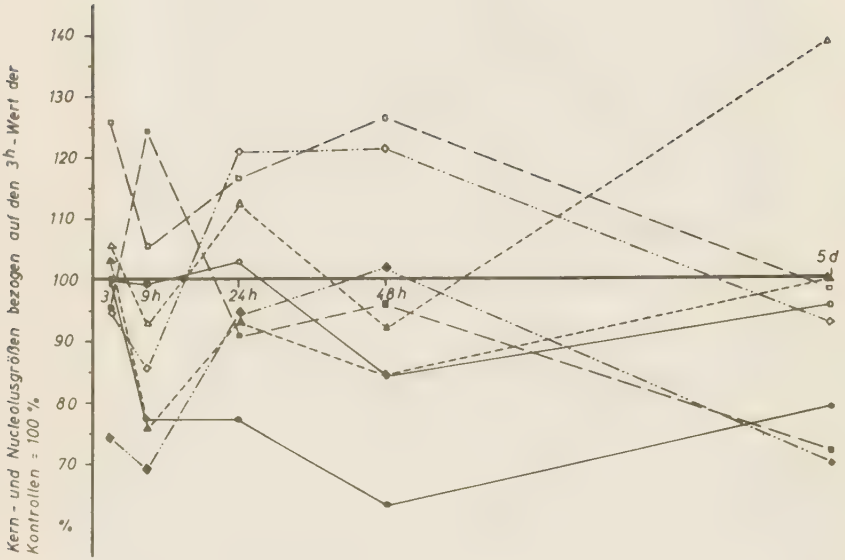

Abb. 2: Verlauf der mittleren Kern- und Nukleolengrößen von HeLa-Zellen bei Bestrahlung mit 500R, Trenimon- u. 500R+Trenimonbehandlung (bezogen auf den 3-Stundenwert der Kontrollen = 100%).

Ordinate: Mittlere Kern- bzw. Nukleolengrößen in %.
Abszisse: Fixierungszeit in Stunden und Tagen.

	Nukleolengrößen	Kerngrößen
Kontrollen:	●——●	○——○
500R :	■— — —■	□— — —□
Trenimon :	◆—..—..◆	◇—..—..◇
500R+Tr n.:	▲--------▲	△--------△

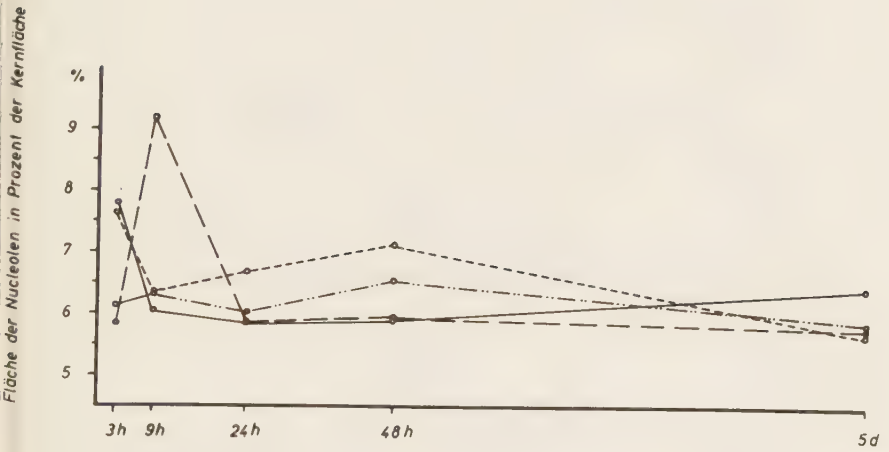

Abb.4: Verlauf der mittleren Nukleolengrößen in Prozent der entsprechenden Kerngrößen von HeLa-Zellen bei Bestrahlung mit 500R, Trenimon- und 500R+Trenimonbehandlung.

Ordinate: Nukleolusgröße in % der Kerngröße.
Abszisse: Fixierungszeit in Stunden und Tagen.

Kontrolle: ———— Trenimon: —..—..—
500R : — — — 500R+Tre.: ----------

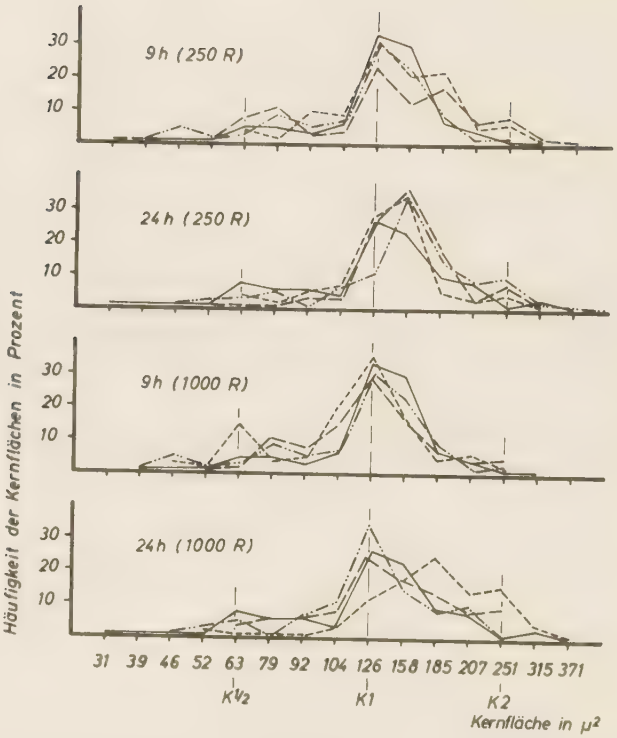

Abb.5: Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Kerngrößen von HeLa-Zellen bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 250R bzw. 1000R.

Ordinate: Häufigkeit der Kernflächen in %.
Abszisse: Kernfläche in μ^2 (logarithm.Maßstab).

Kontrolle : ———— Trenimon : —.—..
250R(1000R) : — — — 250R(1000R)+T.: --------

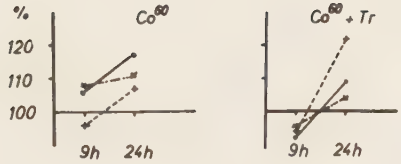

Abb.6a/6b: Verlauf der Dosiseffekte an den Kernen von HeLa-Zellen.

Ordinate: Mittlere Kernfläche in % d. Kontrollfl.
Abszisse: Fixierungszeit in Stunden.

Abb.6a:

250R : —...—...
500R : ————————
1000R: ----------

Abb.6b:

250R+Tren.: —...—...
500R+Tren.: ————————
1000R+Tren.:----------

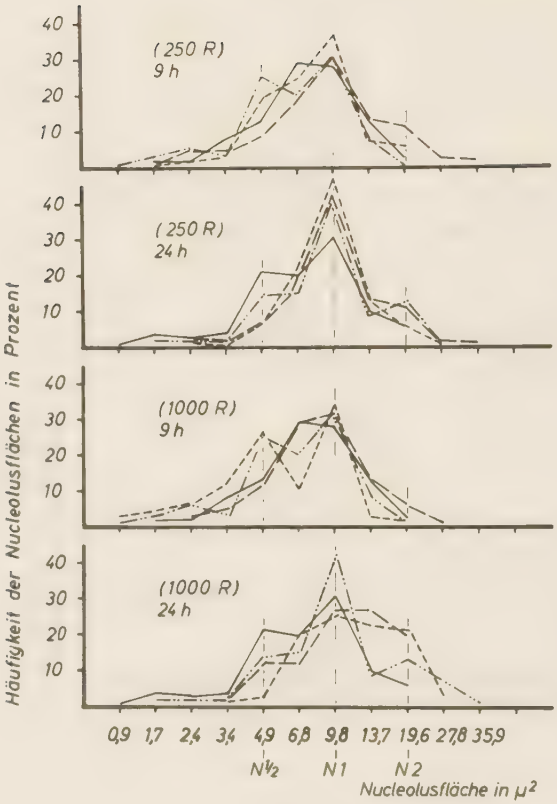

Abb.7: Verlauf der Häufigkeitsverteilung der Nukleolengrößen von HeLa-Zellen bei Fixierungszeiten von 9 und 24 Stunden nach Bestrahlung mit 250R bzw. 1000R.

Ordinate: Häufigkeit der Nuklcolenflächen in %.
Abszisse: Nukleolusfläche in μ^2 (log. Maßstab).

Kontrolle : ———— Trenimon : —·.—·.
250R (1000R): — — — 250R(1000R)+T: --------

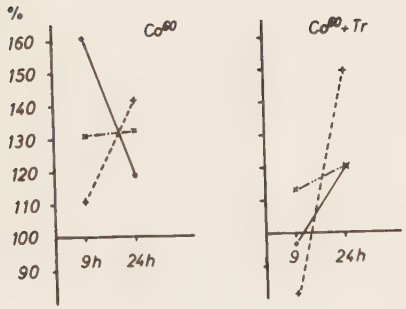

Abb.8a/8b: Verlauf der Dosiseffekte an den Nukleolen von HeLa-Zellen.

Ordinate: Mittlere Nukleolusfläche in % d. Kontrollfl.
Abszisse: Fixierungszeit in Stunden.

Abb.8a:

250R : —...—...
500R : ————————
1000R: ----------

Abb.8b:

250R+Tren.: —...—...—
500R+Tren.: ————————
1000R+Tren.: ----------

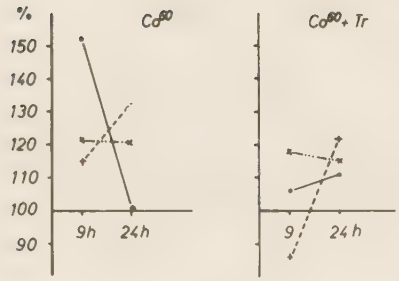

Abb.9a/9b: Verlauf der Dosiseffekte an den Nukleolen von HeLa-Zellen.

Ordinate: Nukleolusfläche in % der Kernfläche.
Abszisse: Fixierungszeit in Stunden.

Abb.9a:

250R : —...—...
500R : ————————
1000R: ----------

Abb.9b:

250R+Tren.: —...—...—
500R+Tren.: ————————
1000R+Tren: ----------

Tab.1: Statistischer Vergleich der Kernflächen von HeLa-Zellen.

$M_1 - M_2$	M_D	σ_D	P	t	$t\sigma_D$	$M_D \gtrless t\sigma_D$	Stat. Sich.
500R+Tr. 3h 500R 3h	298	73	0,27%	3	219	>	+
500R 3h Trenimon 3h	439	78	0,27%	3	234	>	+
500R 9h Trenimon 9h	280	85	0,27%	3	255	>	+
500R 48h 500R+Tr 48h	478	87,3	0,27%	3	261,9	>	+
Tr. 48h 500R+Tr. 48h	413	71	0,27%	3	213	>	+
500R+Tr. 5T. Tr. 5T.	633	77	0,27%	3	231	>	+
500R+Tr. 5T. 500R 5T.	559	96,6	0,27%	3	289,9	>	+

Tab.2: Statistischer Vergleich der Nukleolenflächen von HeLa-Zellen.

$M_1 - M_2$	M_D	σ_D	P	t	$t\sigma_D$	$M_D \gtrless t\sigma_D$	Stat. Sich.
500R+Tr.3h Trenimon3h	31,7	6,03	0,27%	3	18,1	>	+
500R+Tr.3h 500R 3h	10	7	2%	2,33	16,31	<	-
500R+Tr.9h 500R 9h	22,6	33	2%	2,33	76,89	<	-
500R 9h Trenimon9h	50,1	32,1	2%	2,33	74,8	<	-
500R+Tr48h 500R 48h	12,5	25,4	2%	2,33	59,18	<	-
500R+Tr48h Tr. 48h	19,6	5,45	0,27%	3	16,35	>	+
500R+Tr.5T. 500R 5T.	30,1	22,1	2%	2,33	51,49	<	-
500R+Tr.5T. Trenimon5T.	32,4	16,8	2%	2,33	39,14	<	-

Tab.3: Statistischer Vergleich der Dosiseffekte an den Kernen von HeLa-Zellen.

$M_1 - M_2$	M_D	σ_D	P	t	$t\sigma_D$	$M_D \gtrless t\sigma_D$	Stat. Sich.
1000R+Tr.24h 250R+Tr.24h	258	105	2%	2,33	244,6	>	+
1000R+Tr.24h 500R+Tr.24h	191	104,5	2%	2,33	243,5	<	-
1000R+Tr.9h 1000R+Tr.24h	454	105	0,27%	3	313	>	+
500R+Tr. 9h 500R+Tr.24h	276	66	0,27%	3	198	>	+
500R 9h 500R 24h	216	89,6	2%	2,33	208,6	>	+
1000R 9h 1000R 24h	202	85,2	2%	2,33	198,5	>	+

Tab.4: Statistischer Vergleich der Dosiseffekte an den Nukleolen von HeLa-Zellen.

$M_1 - M_2$	M_D	σ_D	P	t	$t\sigma_-$	$M_- \gtrless t\sigma_-$	Diff. sig.
1000R+Tr.9h 1000R+Tr24h	56,6	21,5	1%	2,58	55,47	>	+
500R [illegible] 500R 9h	36,2	16	2%	2,33	83,86	<	-
1000R 9h 1000R [illegible]	37,1	13,8	2	[illegible]	41,8	<	-
1000R+Tr.[illegible] 1000R+Tr24h	45,2	24,7	2%	2,33	57,55	<	-

VI. Literaturverzeichnis:

1) Bauer, E.: Der Krebsarzt 3:3 (1957)
2) Bauer, K.H.: Das Krebsproblem Springer Verlag (Berlin) 2. Aufl. (1963)
3) Beermann, W.: Chromosoma (Berlin) 11:263 (1960)
4) van Bekkum, D.W. a. J. Jongpier: Biochim. Biophys. Acta 16:473 (1955)
5) Bierling, R.: Ther. Ber. (Bayer) 32:252 (1960)
6) Bierling, R. (1960) in K.H. Bauer: Das Krebsproblem Springer Verlag (Berlin) 2. Aufl. (1963)
7) Boell, E.J.: J. cell. comp. Physiol. 39: Suppl. 2:19 (1952)
8) Bodenstein, D.: J. exp. zool. 104:311 (1947)
9) Bucher, O. u. R. Gattiker: Zeitschr. für Anatomie 118:150 (1954)
10) Busch, L.: Ther. Ber. 29:245 (1957)
11) Caspersson, T.O. (1939) in H. Hobitz: Materia medica Nordmark 11:415 (1963)
12) Caspersson, T.O.: Cellgrowth and Cellfunction Norton New York S.159 (1950)
13) Cattley,R.: J. Path. Bact. 13:380 (1909)
14) Dale, W.M., L.H. Gray und W.J. Meredith: Phil. Trans. roy. Soc. London Ser.A 242:33 (1949)
15) Dale, W.M.: In A. Hollaender: Radiation Biology Bd. 1, S.255 New York (1952)

16) David, H.: Z. Ges. inn. Med. 14:63 (1959)

17) Domagk, G., S. Petersen und W. Gauss: Z. Krebsforsch. 59:617 (1954)

18) Domagk, G.: Krebsarzt 12:1 (1957)

19) Domagk, G.: Z. inn. Med. 9:982 (1954)

20) Domagk, G.: Krebsarzt 14:437 (1959) (15.5.1959: 7. Österr. Krebstagung in Salzburg)

21) Domagk, G.: Ärztl. Praxis 12:241, 273 (19607

22) Duryee, W.R.:Bio. Bull. 13:206 (1947)

23)Duryee, W.R.: J. nat. Cancer Just. 10:735 (1949)

24) Erikson, R.L., W. Szybalski: Biochem biophys. Res. commun. 4:258 (1961)

25) Euler, H. u. C.v.Hevesy: Arkiv Kemi, Mineral. Geol. 17A No30 (1944)

26) Faberge, A.C.: Genetics 35:104 (1950)

27) Fink, W.: Verh. dtsch. Ges. Pathol. Hamburg (1954)

28) Fisher, R.A.: Statistical methods for research workers. London (1938)

29) Gärtner, H.: In J. Becker und K. Scheer: Betatron und Telokobalt-Therapie. Springer Verlag Berlin (1958)

30) Gaulden, M.E., R.P. Perry: Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 44:553 (1958)

31) Gerhartz, H., D. Algenstaedt u. I. Kessel: Internist 1:279 (1960)

32) Gerlich, N.: Naturwissenschaften 22:526 (1956)

33) Gerlich, N.: In H. Wilmanns (l.c.) S.80 (1960)

34) Gey, G.O., W.D. Coffman and M.T. Kubicek: Cancer Res. 12:264 (1952)

35) Gropp, A., K. Hupe: Verh. ges Path. 41:268 (1958)

36) Harbers, E.: DMW 27:1395 (1962)

37) Heiberg, K.A. (1908): In K.H. Bauer: Das Krebsproblem Springer Verlag (Berlin) 2. Aufl. (1963)

38) Heiberg, K.A.: Weiteres über Geschwülste. Leipzig (1938)

39) Heitz, E.: Planta med. (Stuttgart) 12:775 (1931)

40) Hobitz, H.: Materia Medica Nordmark 11:415 (1963)

41) Horstmann, E.: Verh. dtsch. ges. Path. 41:361 (1958)

42) Houtermans Th.: Z. Naturforsch. 96:600 (1954)

43) Iverson, R.M., D.W. Stafford: Exp. Cell. Res. 27:118 (1962)

44) Jacoby, W.: Wilhelm Roux' Arch. Entwickl. - Mech. Org. 120:56 (1929)

45) Kaplan, H.S., K.C. Smith, P. Tombin: Nature 190:794 (1961)

46) Killander, D., C. Ribbing, N.R. Ringertz, B.M. Richards: Exp. Cell Res. 27:63 (1962)

47) Killander, D., B.M. Richards a. N.R. Ringertz: Exp. Cell Res. 27:321 (1962)

48) Klein, G. u. A. Forssberg: Exp. Cell Res. 6:211 (1954)

49) Kleinfeld, R.G., E. v. Haam: J. Biochem. biophys. Cytol. 6:393 (1959)

50) Koehler, J.K.: Protoplasma (Wien) 54:493 (1962)

51) Koller, S.: Graphische Tafeln. Darmstadt (1953)

52) Kriss, I.P., L. Révész: Cancer Res. 21:1141 (1961)

53) Lea, D.E., R.B. Haines und C.A. Coulson: Proc. roy. soc. B. 123:1 (1937)

54) Lea, D.E.: Action of Radiation on living cells. Cambridge University Press, London (1946)

55) Letterer, E.: Allgemeine Pathologie. Thieme Verlag Stuttgart (1959)

56) Linke, A. und B. Freudenberger: Über die Chemotherapie der Hämoblastosen und malignen Tumoren. Symposien aktueller therapeutischer Probleme. H.3 Stuttgart (1960)

57) Liss, E. und G. Palme: Naturwiss. 50:672 (1963)

58) McClintock, B.: Z. Zellforsch. 21:294 (1934)

59) Meythaler, F.: Chemotherapeutische Probleme maligner Tumoren. Symposien aktueller chemotherapeutischer Probleme. H.3. Stuttgart (1960)

60) Mulnard, J.: Arch. Biol. 66:525 (1955)

61) Perry, R.P., A. Hella, M. Errera: Biochim. Biophys.Acta (Amst.) 49:47 (1961)

62) Peters, K.: Z. Zellforsch. 44:14 (1956)

63) Peters, K.: Fortschritt auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen. 80:50 (1958)

64) Peters, K.: Habilitationsschrift: "Untersuchungen über die Wirkung von schwachen Strahlendosen auf Gewebekulturen in vitro". Tübingen (1960)

65) Peters, K.: "Nukleolus" in Strahlenpathologie der Zelle. Thieme Verlag Stuttgart (1963)

66) Parchwitz, H.K. u. E.: Strahlentherapie 104:6 (1957)

67) v. Passoneau, J.: Radiat. Res. 1:557 (1955)

68) Pauly, H.: In B. Rajewsky: Wissentschaftliche Grundlagen des Strahlenschutzes. G. Braun. Karlsruhe (1957)

69) Pütter, J.: In K.H. Bauer: Das Krebsproblem. Springer Verlag (Berlin) 2. Aufl. (1963)

70) Quensel, U.: Acta Med. Scand. 68:458 (1928)

71) Rajewsky, B.: Brit. J. Radiol. 25:550 (1952)

72) Schairer, E.: Verh. dtsch. path. Ges. 28:109 (1935) und 30:101 (1937)

73) Scheibe, G., A. Schöntag u. F. Katheder: Naturwiss. 27:499 (1939)

74) Scherer, E., D. Ringleb, L.F. Ventzke: Strahlentherapie 90:41 (1953)

75) Seed, J.: Proc. roy. soc. B. 152:387 (1960)

76) Shubik, P., A.E. Goldfarb, A.C. Ritschie and H. Lisco: AECU 2471 (1952)

77) Stich, H.: Experientia (Basel) 12:7 (1956)

78) Timoféeff-Ressovsky, N.W. und K.G. Zimmer: Das Treffprinzip in der Biologie. Hirzel, Leipzig (1947)

79) Vincent, W.S.: Int. Rev. Cytol. 4:269 (1955)

80) Vorbrodt, A.: Exp. Cell. Res. 15:1 (1958)

81) Wendt, E.: Z. Zellforsch. 49:677 (1959)

82) Willet, F.M., L.V. Foye jr., M. Roth, B. E. Hall: Dis. Chest. 39:1 (1961)

83) Zirkle, R.: Science 117:487 (1953)

Herrn Dozent Dr. K. P e t e r s möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas danken. Was die Ausführung des praktischen Teils dieser Arbeit anbelangt, so gilt Herrn Dr. Peters mein besonderer Dank für die hilfreiche Unterstützung, ebenso für die jederzeit wertvolle Anregung und Beratung bei der Anfertigung der Arbeit.

L e b e n s l a u f

Am 2. Juli 1936 wurde ich, Gertraude S t e i n , in Weimar als Tochter des jetzigen Direktors der Kassenärztlichen Vereinigung Nord-Württemberg Heinrich Stein und seiner Ehefrau Luise geb. Spierling geboren.

Nach Besuch der Grundschule in Prag von 1942 bis 1945 und in Markt bei Augsburg von 1945 bis 1947 war ich Schülerin der Oberschule (Königin-Katharina-Stift) in Stuttgart von 1947 bis 1956, wo ich im Februar 1956 die Reifeprüfung ablegte.

Vom Wintersemester 1956/57 bis Wintersemester 1960/61 studierte ich - mit einer einjährigen Unterbrechung wegen Erkrankung - an der Universität Tübingen Medizin. Im April 1961 bestand ich das Physikum. Anschließend studierte ich je ein Semester an den Universitäten in Kiel und in Wien und seit dem Sommersemester 1962 wieder in Tübingen. Im Dezember 1964 bestand ich das Med. Staatsexamen.